

**EVALUIERUNG ANTIINFLAMMATORISCHER
WIRKSTOFFE MIT ANGRIFF AN DER
EIKOSANOIDBIOSYNTHESE**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Hannah Butschek

geboren am 14. September 1993 in Saulgau

Gutachter

1. apl. Prof. Dr. med. habil. Amelie Lupp, Friedrich-Schiller-Universität Jena
2. Prof. Dr. Oliver Werz, Friedrich-Schiller-Universität Jena
3. PD Dr. Thorsten J. Maier, Goethe-Universität Frankfurt am Main

Datum der öffentlichen Verteidigung: 04. Juni 2019

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
ZUSAMMENFASSUNG	9
1. EINLEITUNG	12
1.1 Entzündungsreaktionen.....	12
1.2 Kaskade der Eikosanoidbiosynthese.....	13
1.2.1 COX-1 und COX-2: Schlüsselenzyme der Prostaglandin-Biosynthese	14
1.2.2 5-LO: Schlüsselenzym der Leukotrien-Biosynthese	17
1.2.3 Physiologische und pathophysiologische Funktionen der Eikosanoide	23
1.3 Pharmakologische Inhibitoren des Arachidonsäure-Stoffwechsels.....	26
1.3.1 Inhibition der Prostaglandin-Synthese	27
1.3.2 Inhibition der Leukotrien-Synthese	29
1.3.3 Duale Inhibitoren des Arachidonsäurestoffwechsels.....	34
1.4 Phytotherapeutika aus Sri Lanka in der antiinflammatorischen Therapie.....	35
1.4.1 Garcinia cambogia	36
1.4.2 Pothos scandens	37
1.4.3 Nyctanthes arbor-tristis	37
1.4.4 Plectranthus zeylanicus	38
1.5 Duale mPGES-1/LTC ₄ -Synthase-Inhibitoren.....	39
2. ZIELE DER ARBEIT.....	41
3. MATERIAL UND METHODEN.....	42
3.1 Material.....	42
3.1.1 Zellen und Blutprodukte	42
3.1.2 Enzyme	42
3.1.3 Kontrollinhibitoren	42
3.1.4 Puffer und Lösungen.....	43

3.1.5	Sonstige Chemikalien	45
3.1.6	Verbrauchsmaterialien	47
3.1.7	Laborgeräte	47
3.1.8	Software und Analytik	48
3.2	Methoden	50
3.2.1	Aufreinigung von humanen PMNL und Monozyten aus Leukozytenkonzentraten	50
3.2.2	Isolierung von rekombinanter 5-LO aus Escherichia coli (BL21).....	51
3.2.3	Bestimmung der 5-LO-Produktbildung am isolierten Enzym, in PMNL, in Monozyten und im Vollblut.....	52
3.2.4	Isolierung von Mikrosomen aus A549-Zellen nach Induktion der mPGES-1	55
3.2.5	Bestimmung der mPGES-1-Produktbildung in Mikrosomen	55
3.2.6	Bestimmung der Zytotoxizität in Monozyten (MTT Assay)	56
3.2.7	Bestimmung der COX-1/COX-2-Produktbildung an isolierter COX-1/COX-2	57
3.2.8	Proximity-Ligation-Assay in Monozyten	57
4.	ERGEBNISSE	60
4.1	Inhibitorisches Potential der Pflanzenextrakte aus Sri Lanka auf die Eikosanoidbiosynthese	60
4.1.1	Inhibierung der Leukotrien-Biosynthese	60
4.1.2	Hemmung der mPGES-1-Aktivität.....	63
4.2	Untersuchung dualer mPGES-1/LTC ₄ -Synthase-Inhibitoren.....	67
4.2.1	Einfluss der dualen mPGES-1/LTC ₄ S-Inhibitoren auf die metabolische Aktivität in humanen Monozyten	67
4.2.2	Hemmung der Leukotrien-Biosynthese durch duale mPGES-1/LTC ₄ S- Inhibitoren.....	68
4.2.3	Einfluss der dualen mPGES-1/LTC ₄ S-Inhibitoren auf die Biosynthese der 12- und 15-HETE in humanen PMNL.....	71

4.2.4	Lipidmediatorprofil der dualen mPGES-1/LTC ₄ S-Inhibitoren	72
4.2.5	Evaluation der direkten Hemmung der COX-1 und der COX-2 durch duale mPGES-1/LTC ₄ S-Inhibitoren	78
4.2.6	Evaluation der Interaktion zwischen 5-LO und FLAP durch duale mPGES-1/LTC ₄ S-Inhibitoren	79
5.	DISKUSSION	82
6.	SCHLUSSFOLGERUNGEN	95
7.	LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS	97
ANHANG 1: LEBENSLAUF		108
ANHANG 2: EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG		109
ANHANG 3: DANKSAGUNGEN		110

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

12-HHT	12-Hydroxyheptadecatriensäure
A23187	Calcium-Ionophor
AA	Arachidonsäure
ACN	Acetonitril
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
Ca²⁺	Calcium-Ion (zweiwertig)
COPD	chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (chronic obstructive pulmonary disease)
COX	Cyclooxygenase
cPGES	zytosolische Prostaglandin E-Synthase
cPLA₂	zytosolische Phospholipase A ₂
CYP	Cytochrom P450
Cys-LT	Cysteinylleukotriene
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCM	Dichlormethan
DHA	Docosahexaensäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EET	Epoxyeicosatetraensäure
EPA	Eikosapentaensäure
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
FCS	fetales Kälberserum
Fe^{2+/3+}	Eisenion (zweiwertig/dreiwertig)
FeCl₂	Eisen(II)-chlorid

FeSO₄	Eisen(II)-sulfat
FLAP	5-Lipoxygenase-aktivierendes Protein
GC	<i>Garcinia cambogia</i>
GSH	Gluthation
HEK	human embryonic kidney
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
HPETE	Hydroperoxyeicosatetraensäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)
i.E.	isoliertes Enzym
IC₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IL	Interleukin(e)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
KPI	Kaliumphosphatpuffer
LB-Medium	Lysogeny-broth-Medium
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (liquid chromatography-mass spectrometry)
LO	Lipoxygenase(n)
LT	Leukotrien(e)
LTC₄S	Leukotrien C ₄ -Synthase
LX	Lipoxin(e)
MAPEG	Membran-assoziierte Proteine im Eikosanoid- und Gluthationstoffwechsel
MeOAc	Methylacetat
MeOH	Methanol
Mg²⁺	Magensiumion (zweiwertig)
MgSO₄	Magnesiumsulfat
mPGES	mikrosomale Prostaglandin E-Synthase
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NMR	Kernspinresonanz (nuclear magnetic resonance)

NSAR	nicht-steroidale Antirheumatika
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cell)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate-buffered saline)
PenStrep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PG	Prostaglandin(e)
PL	<i>Plectranthus zeylanicus</i>
PLA	proximity ligation assay
PMNL	polymorphkernige Leukozyten (polymorphonuclear leukocytes)
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
POT	<i>Pothos scandens</i>
RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institute-Medium
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SF	<i>Nyctanthes arbor-tristis</i>
SPM	specialized pro-resolving mediators
STI	Trypsin-Inhibitor aus der Sojabohne
syn	synonym
TEA	Triethanolamin
TFA	Trifluoressigsäure
TX	Thromboxan
UPLC	Ultraleistungsflüssigkeitschromatographie (ultra performance liquid chromatography)

ZUSAMMENFASSUNG

Die Inhibition der enzymatischen Entstehung von Lipidmediatoren (LM) wie die der Prostaglandine (PG) und Leukotriene (LT) ist aufgrund der zentralen Bedeutung dieser Mediatoren in der Entzündungsreaktion essentiell für eine effektive antiinflammatorische Therapie. Seit Jahrzehnten sind hierfür die nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR) das Mittel der Wahl in der Langzeittherapie, was jedoch teilweise mit beträchtlichen Nebenwirkungen verbunden ist. Seitens der Forschung werden daher weiterhin intensive Anstrengungen unternommen, neue Wirkstoffe mit geringeren Nebenwirkungen zu entwickeln. Dabei rücken insbesondere pflanzliche Stoffe aufgrund ihrer geringeren Kosten bei höherer Effektivität und geringeren Nebenwirkungen in den Fokus. Als wünschenswerte Eigenschaft von neu entwickelten Wirkstoffen gilt insbesondere die Hemmung der Entstehung proinflammatorischer LM bei gleichzeitig unbeeinflusster Synthese antiinflammatorischer LM bzw. sogenannter „specialized pro-resolving mediators“ (SPM).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung neuer sowohl synthetischer als auch pflanzlicher Wirkstoffe hinsichtlich ihres inhibitorischen Potentials auf verschiedene Enzyme des Arachidonsäure (AA)-Stoffwechsels. Im ersten Teil der Arbeit wurden vier Pflanzenextrakte aus Sri Lanka (*Garcinia cambogia* (GC), *Pothos scandens* (POT), *Nyctanthes arbor-tristis* (SF) und *Plectranthus zeylanicus* (PL)) untersucht, welche mit Extraktionsmitteln unterschiedlicher Lipophilie (Hexan, Dichlormethan (DCM), Ethylacetat (EtOAc) und Methanol (MeOH)) gewonnen wurden. Der zweite Teil umfasste die nähere Charakterisierung synthetischer Substanzen (CTA1, CTA2, SZK1 und SZK5), welche in Docking-Studien an der mikrosomalen PGE-Synthase-1 (mPGES-1) und der LTC₄-Synthase (LTC₄S) designiert wurden. Die Untersuchung dieser Substanzen erfolgte unter unterschiedlichen Stimulationsbedingungen sowohl am isolierten Enzym (i.E.) als auch in humanen zellulären Systemen (polymorphkernige Leukozyten (PMNL), Monozyten und Vollblut).

Bei der Analyse der Pflanzenextrakte aus Sri Lanka stellten sich die lipophilen Extrakte aus GC (1-3) als potente duale Inhibitoren der 5-LO (mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀) i.E. < 0,24 µg/ml, IC₅₀ PMNL < 1,55 µg/ml) und der mPGES-1 (IC₅₀ < 0,85 mg/ml) heraus. Die PL-Extrakte PL-8 und PL-20 führten zu einer selektiven Inhibition der 5-LO, wobei eine deutlich potentere Hemmung durch PL-20 verzeichnet wurde (i.E.: PL-8 IC₅₀ = 1,29 µg/ml, PL-20 IC₅₀ = 0,12 µg/ml; PMNL: PL-8 IC₅₀ = 5,31 µg/ml, PL-20 IC₅₀ = 1,70 µg/ml). PL-8 und PL-20 wurden mit dem lipophilen Extraktionsmittel DCM extrahiert, was aufgrund der starken Effekte

die Vermutung nahelegt, dass die enthaltenen Wirkstoffe lipophil sind. Die Extrakte aus POT waren sehr wirkungsvoll in der Hemmung von rekombinanter mPGES-1 ($IC_{50} < 0,5 \mu\text{g/ml}$) und enthalten vermutlich sowohl lipo- als auch hydrophile Komponenten. Die Extrakte aus SF erbrachten weder eine signifikante Hemmung der mPGES-1 noch der 5-LO. Insgesamt stellen die Ergebnisse dieses ersten Teils der vorliegenden Arbeit die Basis für weiterführende Untersuchungen hinsichtlich des pharmakologischen Potentials dieser Pflanzenextrakte dar, wobei die Extrakte nach Ausschluss einer zytotoxischen Wirkung in weiteren zellulären Systemen und *in vivo* getestet werden sollten.

Aufgrund der ausgeprägten inhibitorischen Potenz der Testsubstanzen CTA1, CTA2, SZK1 und SZK5 mit IC_{50} -Werten im unteren einstelligen μM -Bereich auf Vertreter der „Membran-assoziierten Proteine im Eikosanoid- und Gluthationstoffwechsel“ (MAPEG)-Superfamilie (mPGES-1 und LTC₄S), wurden diese Substanzen im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit auf weitere Enzyme der AA-Kaskade getestet. Unter unterschiedlichen Stimulationsbedingungen wurde die 5-LO-Aktivität durch CTA1 und CTA2 sowohl im isolierten Enzym (CTA1 $IC_{50} = 0,17 \mu\text{M}$, CTA2 $IC_{50} = 0,04 \mu\text{M}$) und, wie erwartet, mit abnehmender Potenz auch in zellulären Systemen (PMNL (CTA1 $IC_{50} = 1,8 \mu\text{M}$, CTA2 $IC_{50} = 1,1 \mu\text{M}$), Monozyten ($\geq 1 \mu\text{M}$), Vollblut ($\geq 3 \mu\text{M}$)) gehemmt, was für die Klassifizierung von CTA1 und CTA2 als direkte 5-LO-Inhibitoren spricht. Weiterhin wurde in PMNL und im Vollblut die Synthese der SPM wie beispielsweise 15-Hydroxyeicosatetraensäure (15-HETE) nicht inhibitorisch beeinflusst, womit CTA1 und CTA2 vermutlich außerdem einen positiven Einfluss auf den physiologischen Prozess der Entzündungsauflösung nehmen. Zudem wurde durch CTA2 die Interaktion zwischen der 5-LO und dem 5-Lipoxygenase-aktivierenden Protein (FLAP) an der Kernmembran inhibiert, was mit Hilfe des Proximity-Ligation-Assays (PLA) dargestellt wurde. Dies spricht für eine Bindung von CTA2 an die 5-LO bzw. an die 5-LO und an das FLAP, was CTA2 zusätzlich als indirekten 5-LO-Inhibitor charakterisiert. CTA1 scheint die 5-LO/FLAP-Komplexbildung hingegen nur schwach zu hemmen und fungiert damit vorwiegend als direkter 5-LO- und LTC₄S-Inhibitor. Die PG-Kaskade wurde durch CTA1 und CTA2 in rekombinanter Cyclooxygenase (COX)-1 und COX-2 nicht inhibitorisch beeinflusst, was auf geringere Nebenwirkungen der Testsubstanzen gegenüber den NSAR hoffen lässt, da physiologisch relevante PG ungehindert synthetisiert werden können. Zusammenfassend ergaben die Untersuchungen eine wesentlich höhere Affinität der Testsubstanzen gegenüber der 5-LO als gegenüber der mPGES-1.

SZK1 und SZK5 inhibierten die 5-LO in PMNL (SZK1: $IC_{50} = 3,93 \mu M$, SZK5: $IC_{50} = 1,40 \mu M$) und in Monozyten ($\geq 1 \mu M$) ebenfalls, im Vollblut konnte jedoch keine 5-LO-Hemmung mehr nachgewiesen werden. Dies könnte in Zusammenhang mit der hohen Lipophilie und Elektronegativität der Substanzen stehen, durch welche SZK1 und SZK5 zum einen durch eine verstärkte Plasmaproteinbindung, zum anderen durch erschwerte Membrangängigkeit nicht zum Wirkort gelangen können. Die Interaktion zwischen der 5-LO und dem FLAP an der Kernmembran wurde durch SZK1 und SZK5 ebenso wie durch CTA2 inhibiert, was damit ebenfalls für eine sterische Hemmung über die Bindung an die 5-LO bzw. 5-LO und FLAP spricht. Auf die COX-1 hatte lediglich SZK5 einen leichten inhibitorischen Einfluss ($\geq 3 \mu M$), die COX-2-Aktivität blieb durch die Substanzen unbeeinflusst. Diese Ergebnisse, vor allem die weiterhin potente Inhibition von CTA1 und CTA2 in humanem Vollblut, legen weiterführende Untersuchungen insbesondere dieser Substanzen *in vivo* nahe.

Insgesamt wurde mit der vorliegenden Arbeit die Basis für weiterführende Untersuchungen sowohl der synthetischen Substanzen als auch der pflanzlichen Extrakte geschaffen. Damit leisten die Ergebnisse einen weiteren Beitrag zur möglichen Entwicklung eines neuen antiinflammatorischen Wirkstoffes, wobei die Hoffnung auf geringe Nebenwirkungen bei hoher Potenz bestehen bleibt.

1. EINLEITUNG

1.1 Entzündungsreaktionen

Die akute Entzündung wurde bereits in der Antike von Galenus durch die fünf klinischen Charakteristika *CALOR* (Wärme), *RUBOR* (Rötung), *TUMOR* (Schwellung), *DOLOR* (Schmerz) und *FUNCTIO LAESA* (Funktionsverlust) beschrieben (Rather 1971). Diese Antworten des Immunsystems sind physiologische Reaktionen, welche der Abwehr und Eliminierung von sowohl endo- als auch exogenen Noxen dienen (Stables und Gilroy 2011). Virale, bakterielle und parasitäre Infektionen wie auch mechanische, chemische oder physikalische Gewebsverletzungen können einen Entzündungsprozess hervorrufen. Neben Gewebshormonen wie Bradykinin und Histamin werden auch Lipidmediatoren (LM) wie Leukotriene (LT) und Prostaglandine (PG) freigesetzt (Kolaczowska und Kubes 2013). Diese Mediatoren führen zu einer lokalen Gefäßdilatation und der damit verbundenen Hyperämie und Erwärmung (*CALOR* und *RUBOR*) des geschädigten Gebiets. Zudem beeinflussen sie die Gefäßpermeabilität und lassen Kapillaren durchlässig für bestimmte Blutbestandteile werden. Diese Exsudation von zunächst proteinhaltigem Plasma und Fibrin äußert sich in einer Schwellung (*TUMOR*) des Gebiets. Der dadurch erhöhte Gewebedruck reizt Nervenendigungen, was wiederum zur Entstehung von Schmerzen (*DOLOR*) führt. Anschließend werden durch Chemotaxis weitere Zellen wie Granulozyten, Leukozyten, Monozyten und Makrophagen angelockt, welche dann, unter anderem durch Phagozytose und Freisetzung von toxischen Substanzen, das Pathogen eliminieren (Medzhitov 2008, Buckley et al. 2014).

Fehlregulierte Entzündungsreaktionen können dem Körper jedoch schaden und sind oft Ursache für akute (Bsp. Sepsis) und chronische Erkrankungen wie COPD (chronic-obstructive pulmonary disease) oder rheumatoide Arthritis (Shah et al. 2017). Dabei richtet sich die Abwehrreaktion fälschlicherweise unter anderem gegen körpereigene Strukturen.

Die bisher verfügbaren antiinflammatorischen Wirkstoffe beeinflussen auf unterschiedlichen Wegen meist mehrere Entzündungsmediatoren (Meirer et al. 2014). Im Folgenden steht die Synthese dieser LM, insbesondere die der LT und PG, im Mittelpunkt.

1.2 Kaskade der Eikosanoidbiosynthese

Eikosanoide sind LM, die an einer Vielzahl von physiologischen Prozessen beteiligt sind. Gemeinsam ist ihnen der Ursprung aus der Arachidonsäure (AA), Eikosapentaensäure (EPA) oder Docosahexaensäure (DHA). Die AA ist eine vierfach ungesättigte omega-6-Fettsäure, bestehend aus 20 C-Atomen (C20:4ω6), die ausschließlich in membrangebundenen Phospholipiden vorkommt (Radmark et al. 2007). Die Doppelbindungen sind an den C-Atomen 5, 8, 11 und 14 lokalisiert (**Abb. 1**).

Aus der Zellmembran wird die veresterte Fettsäure durch die zytosolische Phospholipase A₂ (cPLA₂) durch Hydrolyse freigesetzt. Die Aktivierung der cPLA₂ erfolgt durch verschiedene Mediatoren wie z.B. Bradykinin, Wachstumsfaktoren oder inflammatorische Zytokine, welche zur Erhöhung des intrazellulären Calcium (Ca²⁺)-Spiegels und Aktivierung von Proteinkinasen führen. Um seine maximale Aktivität zu erlangen, muss das Enzym phosphoryliert vorliegen und Ca²⁺ gebunden haben (Kramer und Sharp 1997). Freie AA kann schließlich über verschiedene Enzyme zu den Eikosanoiden metabolisiert werden (**Abb. 1**).

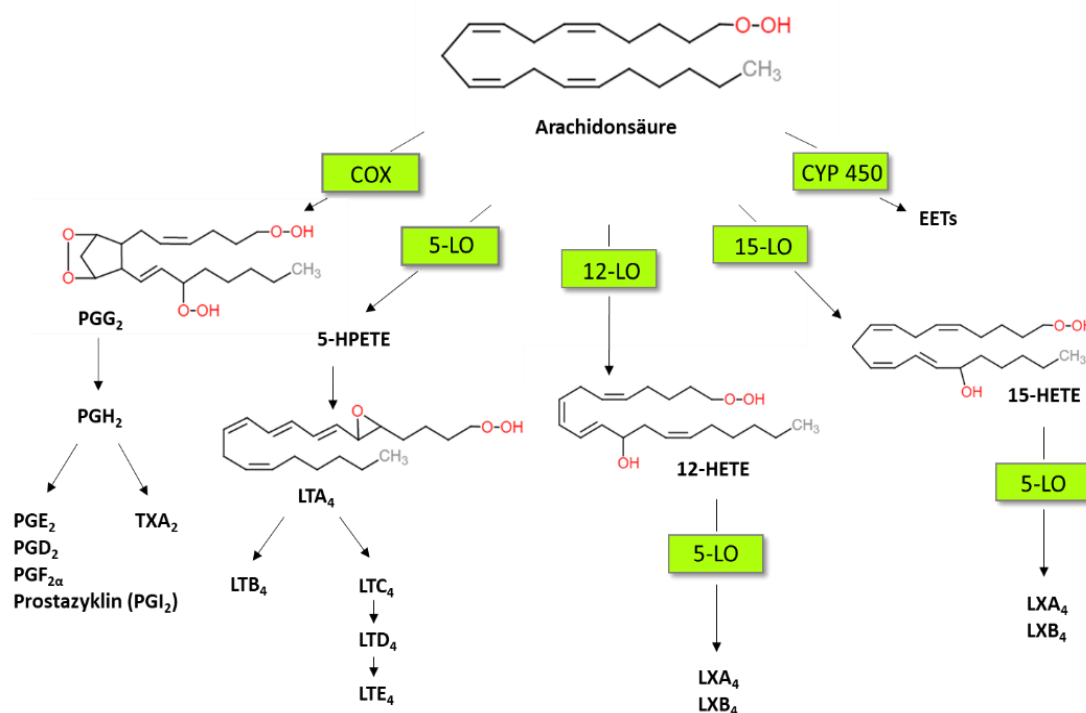


Abb. 1: Metabolisierungswege der Arachidonsäure.

Durch die cPLA₂ wird aus der Plasmamembran freigesetzte AA über drei Hauptwege zu den jeweiligen Eikosanoiden umgesetzt. PG entstehen durch die COX, LT und LX über den 5-LO-Weg und EET über das Cytochrom-P450 (CYP)-System.

Die Synthese von PG und Thromboxan A₂ (TXA₂) wird durch das Schlüsselenzym Cyclooxygenase (COX) reguliert, die Biosynthese der proinflammatorischen LT und antiinflammatorischen Lipoxine (LX) erfolgt über Lipoxygenasen (LO) und die Epoxyeicosatetraensäuren (EET) werden über das Enzym Cytochrom P450 (CYP) gebildet (Samuelsson 1987).

1.2.1 COX-1 und COX-2: Schlüsselenzyme der Prostaglandin-Biosynthese

Bisher sind zwei Isoenzyme der COX (syn. PGH-Synthase) bekannt (Fuster und Sweeny 2011). Die COX-1 wird im Körper konstitutiv exprimiert und ist für die Funktion bestimmter Organe wie Niere und Magen verantwortlich (Botting 2006). Beispielsweise werden durch die Produkte der COX die Nierendurchblutung reguliert, der Schutz der Magenschleimhaut aufrecht erhalten oder die Thrombozytenaggregation moduliert (Crofford 1997). Die COX-2 ist nicht, wie lange vermutet, nur am Entzündungsgeschehen beteiligt, sondern erfüllt auch lebenswichtige Funktionen in der Niere und im zentralen Nervensystem wie die Modulation des Schmerzes auf Rückenmarksebene oder die Regulierung des Salz- und Wasserhaushaltes über das Renin-Angiotensin-System (Hinz und Brune 1999). Im Entzündungsprozess wird die COX-2 durch proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 β (IL-1 β) und Tumornekrose-Faktor- α (TNF- α) verstärkt exprimiert (Botting 2006). Die COX-1 und COX-2 weisen viele strukturelle Gemeinsamkeiten auf. So zeigen sie eine in vielen Regionen übereinstimmende Aminosäuresequenz und insgesamt eine Sequenzhomologie von ca. 60%. Eine Besonderheit ist eine Aminosäure (AS)-Substitution im aktiven Zentrum der COX-2 im Vergleich zur COX-1: Ile-523 in der COX-1 ist durch ein Valin in der COX-2 ersetzt. Dies resultiert in einem engeren hydrophoben Teilabschnitt, welcher nur für selektive COX-2-Inhibitoren zugänglich ist (Kurumbail et al. 1996, Simmons et al. 2004).

1.2.1.1 Biosynthese der Prostanoid

Nach der Freisetzung der AA aus der Zellmembran wird die freie AA durch die COX-1 bzw. COX-2 zunächst in ein zyklisches Intermediat umgewandelt: das instabile PGH₂ (Smith et al. 2000). Dies stellt das gemeinsame Ausgangssubstrat der Prostanoid dar. AA bindet mit seiner Carboxylgruppe im aktiven Zentrum der COX, welches sich in einem Kanal des Enzyms befindet, in der Nähe von Arg-120 und Tyr-355. Die ω -6-Endung der AA befindet sich schließlich in einer hydrophoben Rinne und wird über Ser-530 fixiert (Vecchio et al. 2012). Die anschließende Reaktion erfolgt in zwei Teilschritten. Sowohl die COX-1 als auch die COX-2 besitzen Cyclooxygenase- und Peroxidaseaktivität, welche im Enzym zwar räumlich

voneinander getrennt, jedoch strukturell und funktionell miteinander verbunden sind (Marshall und Kulmacz 1988, Smith und Marnett 1991, Rao und Knaus 2008). Zuerst lagert die COX im Inneren des Enzyms über einen radikalischen Mechanismus zwei molekulare Sauerstoffatome an die AA an. Dabei entsteht das instabile Produkt PGG_2 . Die Katalyse dieses Schrittes stellt den Angriffspunkt der nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR) dar (siehe Kapitel 1.3.1.1). Danach wird durch die Peroxidase, welche sich nahe der Enzymoberfläche befindet, die Hydroperoxidgruppe ($-\text{OOH}$) am C15-Atom zu einer Hydroxylgruppe ($-\text{OH}$) reduziert. Das entstandene Produkt ist das instabile PGH_2 (Rao und Knaus 2008). Je nach Enzymausstattung und Anforderung des jeweiligen Gewebes kann PGH_2 zu PGE_2 , PGD_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGI_2 (syn. Prostazyklin) bzw. TXA_2 umgesetzt werden (**Abb. 2**).

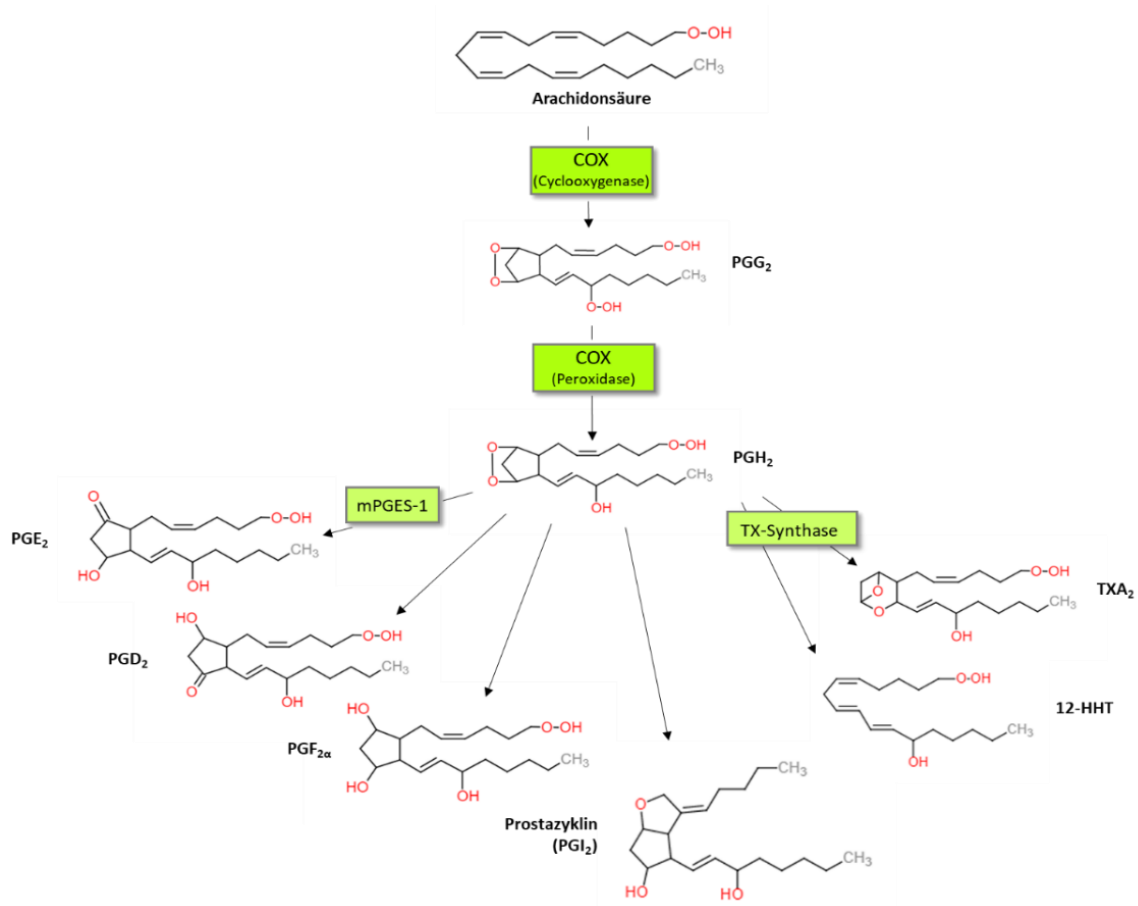


Abb. 2: Signalkaskade der PGH-Synthase.

Freie AA wird durch zyklische Oxygenierung zum instabilen PGG_2 und anschließende Reduktion zu PGH_2 metabolisiert. Entsprechende PG-Synthasen setzen PGH_2 zu den jeweiligen Prostanoiden um.

PGD_2 wird durch die PGD_2 -Synthase aus PGH_2 synthetisiert oder entsteht aus PGE_2 durch Isomerisierung (Joo und Sadikot 2012). Die Bildung von $\text{PGF}_{2\alpha}$ erfolgt durch die Aldoketoreduktase $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Synthase, entweder direkt aus PGH_2 oder durch Reduktion von

PGD₂ oder PGE₂ (Dozier et al. 2008). Prostazyklin wird durch die PGI₂-Synthase, ein Häm-Protein, welches sich an der Innenseite der Membran des Endoplasmatischen Retikulums befindet, aus PGH₂ synthetisiert. Der physiologische Gegenspieler von Prostazyklin ist das TXA₂. Es entsteht aus PGH₂ durch eine Umlagerungsreaktion in der Thromboxan-Synthase. Diese Reaktion unterliegt einem selbstregulierenden „Feedback-Mechanismus“ (Hall et al. 1986). Die Thromboxan-Synthase bildet zudem das C17-Produkt 12-Hydroxyheptadecatriensäure (12-HHT), welches durch Abspaltung eines C3-Anteils (Malonyldialdehyd) aus der C20-Fettsäure entsteht.

1.2.1.2 mPGES-1: Schlüsselenzym der Biosynthese von Prostaglandin E₂

Besonderes Augenmerk soll an dieser Stelle, aufgrund der Relevanz für die vorliegende Arbeit (siehe Kapitel 3.2.5), auf die Synthese von PGE₂ durch die mPGES-1 gelegt werden. Das Ausgangssubstrat PGH₂ kann durch PGE₂-Synthasen zu PGE₂ metabolisiert werden. Von diesem Enzym sind bisher drei Varianten bekannt: die membrangebundenen mikrosomalen PGE-Synthasen (mPGES) 1 und 2 sowie die zytosolische PGE-Synthase (cPGES) (Gudis et al. 2005). Die mPGES-2 und die cPGES sind konstitutiv exprimierte Enzyme, die für die Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase verantwortlich sind. Die Expression der mPGES-1 (Jakobsson et al. 1999a) ist unter normalen Bedingungen sehr niedrig, lässt sich jedoch durch proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β induzieren, was ein Grund für das zunehmende Interesse der Forschung an diesem Enzym als Zielstruktur für neue antiinflammatorische Therapeutika ist (Koeberle et al. 2016). Die Induktion ist mit einer ebenfalls erhöhten Expression der COX-2 assoziiert, was sich durch Unterschiede in der bevorzugten Metabolisierung erklären lässt. So setzt die cPGES primär COX-1-produziertes PGH₂ um, die mPGES-1 hingegen durch die COX-2 synthetisiertes PGH₂. Die mPGES-2 metabolisiert beide Substrate gleichermaßen (Murakami et al. 2000).

Die mPGES-1 besteht aus 152-153 AS und benötigt Gluthation (GSH) als essentiellen Cofaktor. Damit gehört sie zur „Membran-assoziierten Proteine im Eikosanoid- und Gluthationstoffwechsel“ (MAPEG)-Superfamilie und weist zudem eine starke Homologie zu anderen Proteinen dieser Familie auf, wie beispielsweise das 5-Lipoxygenase-aktivierende Protein (FLAP) und die LTC₄-Synthase (LTC₄S) (Jakobsson et al. 1999b, Samuelsson et al. 2007). Die mPGES-1 ist wie auch FLAP ein Homotrimer, wobei die Monomere jeweils aus vier Transmembranhelices bestehen. Diese formen drei aktive Zentren, welche sich je aus den Helices 1, 2 und 4 sowie dem zytoplasmatischen C-Terminus zusammensetzen. Da PGH₂ an der luminalen Seite des Endoplasmatischen Retikulums gebildet wird, muss dieses durch die

Membran zum aktiven Zentrum der mPGES-1 diffundieren, welches sich auf der zytoplasmatischen Seite befindet (Sjogren et al. 2013). Die Bindung von GSH als Voraussetzung zur Aktivierung des Enzyms wird vermutlich über die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung von Ser-127 stabilisiert (Koeberle et al. 2016), dabei sind unter anderem die AS Arg-126 und Asp-49, nahe der Bindungsstelle von GSH, essentiell für die katalytische Aktivität (Raouf et al. 2016).

Das Produkt PGE₂, das häufigste Prostanoid im Körper, vermittelt seine proinflammatorische, pyretische und schmerzfördernde Wirkung über die vier verschiedenen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren EP1-EP4 (siehe Kapitel 1.2.3.1) (Kawahara et al. 2015).

1.2.2 5-LO: Schlüsselenzym der Leukotrien-Biosynthese

Lange Zeit schon waren die PG bekannt und deren Rolle im Entzündungsprozess erforscht, als 1976 die 5-LO erstmals in Kaninchenleukozyten beschrieben wurde (Borgeat et al. 1976). LOs finden sich nicht nur in Mensch und Tier, sondern auch in Pflanzen und Pilzen. Im Menschen werden sie in Immun-, Epithel- und Tumorzellen exprimiert, wo sie die Synthese von proinflammatorischen LT und antiinflammatorischen LX katalysieren. Damit spielen sie eine wichtige Rolle im Entzündungsgeschehen sowie bei Haut- und Tumorerkrankungen (Newcomer und Brash 2015). Für die Inflammation ist v.a. deren induzierbare Expression in Mastzellen, Granulozyten und Makrophagen von Bedeutung (Radmark und Samuelsson 2009).

Die 5-LO ist eine Dioxygenase und katalysiert im Metabolismus der AA über einen Zwischenschritt folgende Reaktion: über einen radikalischen Mechanismus werden zwei molekulare Sauerstoffatome an die Doppelbindung einer 1,4-Pentadienstruktur angelagert (Pistorius und Axelrod 1974, Ivanov et al. 2010). Die entstehende Hydroperoxidgruppe zerfällt anschließend zu einer Epoxidgruppe (siehe Kapitel 1.2.2.2). Diese Reaktion wurde auch bei fünf weiteren LOs des menschlichen Körpers detektiert: in Retikulozyten bei zwei Isoformen der 15-LO, in Thrombozyten bei einer 12-LO, welche auch die R-Konfiguration erzeugen kann (12R-LO), und einer epidermalen LO (eLO-3) (Mashima und Okuyama 2015, Radmark et al. 2015). Die Nomenklatur des jeweiligen Enzyms erfolgt dabei nach der Position des C-Atoms, an der die Reaktion vonstattengeht.

Das Gen der 5-LO befindet sich auf dem Chromosom 10, die anderen LOs sind auf dem Chromosom 17 codiert (Radmark et al. 2015). Die 5-LO besteht aus 672-673 AS und ist ein Protein, welches ein nicht-hämgebundenes Eisenion ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$) im katalytischen Zentrum

aufweist, das während der Reaktion als Elektronenakzeptor bzw. -donator fungiert (Pistorius und Axelrod 1974, Steinhilber und Hofmann 2014). Das Enzym besteht aus zwei Domänen, der N-terminalen β -Sandwich-Domäne (C2-like-domain) und der C-terminalen Domäne mit katalytischer Aktivität. Im aktiven Zentrum des C-Terminus ist $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ über His-371, His-550 und Ile-673 gebunden (**Abb. 3**). Beteiligt sind außerdem Asn-554 und His-367 sowie ein Wassermolekül (Radmark und Samuelsson 2009). Diese Verankerung von $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ über die 2-His-1-Carboxylat-Triade ist bei vielen nicht-hämgebundenen Eisenenzymen üblich (Hegg und Que 1997). Die Funktion des C-Terminus als einer der Eisenliganden wird über eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen den AS Asn-669 und His-399 stabilisiert, welche eine C-terminale Schleife ausbilden (Okamoto et al. 2005, Radmark und Samuelsson 2009).

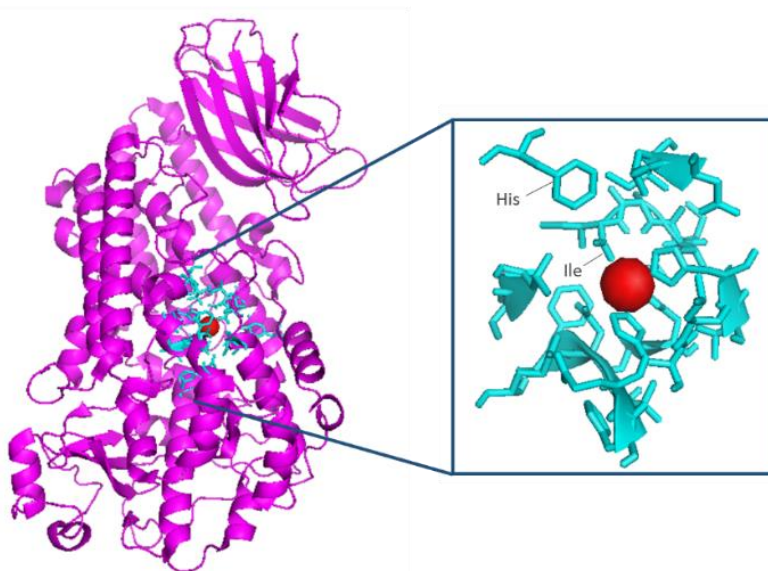


Abb. 3: Kristallstruktur der 5-LO.

Der regulatorische N-Terminus (C2-like-Domäne) mit der β -Sandwich-Struktur (oben rechts) ist in Magenta dargestellt. Die katalytische C-terminale Domäne zeigt sich vergrößert in Cyan mit dem zentralen Eisenion in Rot. Dieses ist unter anderem über die AS His und Ile gebunden (Gilbert et al. 2011).

Zur Aktivierung der 5-LO werden unter anderem Ca^{2+} und Adenosintriphosphat (ATP) benötigt. Durch erhöhten Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle bindet Ca^{2+} an die C2-like-Domäne des N-Terminus der 5-LO und die 5-LO transloziert vom Zytosol zur Kernmembran, wo die Ca^{2+} -Bindung die Verankerung der 5-LO an Phosphatidylcholin induziert (Radmark und Samuelsson 2009, Smyrniotis et al. 2014). Für die Translokation ist v.a. die N-terminale Domäne verantwortlich (Woods et al. 1993, Chen und Funk 2001). ATP bindet ebenfalls an die N-terminale Domäne, erhöht damit die Aktivität des Enzyms und stabilisiert dieses. Die an der Ca^{2+} -Bindung beteiligten AS sind in der Schleife 2 der C2-like-Domäne lokalisiert, dabei handelt es sich um Asn-43, Asp-44 und Glu-46 (Hammarberg et al. 2000). Durch die Ca^{2+} -Bindung werden negative Ladungen der AS des N-Terminus neutralisiert und das Enzym somit lipophiler, wodurch die Bindung an die ebenfalls lipophile Kernmembran erleichtert wird. Die Bindung der 5-LO an das Phosphatidylcholin der Membran erfolgt unter anderem über Trp-13,

Trp-75 und Trp-102 (Gerstmeier et al. 2016b). An der Kernmembran kolokalisiert die 5-LO mit dem FLAP, von dem sie das Substrat (AA) erhält. Das aktive Zentrum der 5-LO in der α -Helix des C-Terminus ist jedoch zunächst durch die nach innen gerichteten Seitenketten der AS Tyr-181 und Phe-177 versperrt, was durch Trp-599 zusätzlich gesichert wird (Radmark et al. 2015). Tyr-181 ist darüber hinaus mit Ala-603 über Van-der-Waals-Kräfte verbunden, wodurch der Zugang zum zentralen $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ weiter eingeschränkt ist. Um den Zutritt der Pentadien-Struktur ins aktive Zentrum zu ermöglichen, kommt entweder die Entfernung des PheTyr-Verschlusses in Betracht oder eine Rotamerendrehung der AS Trp-147 auf der entgegengesetzten Seite des katalytischen Zentrums (Gilbert et al. 2011, Gerstmeier et al. 2016b).

Die Expression und Aktivität der 5-LO wird durch verschiedene Faktoren bestimmt, wie beispielsweise Phosphorylierung, Proteinaktivierung durch Phosphatidylcholin, ATP, Ca^{2+} und/oder Magnesiumionen (Mg^{2+}), Protein-Protein-Interaktionen, Redoxstatus oder zelluläre Kompartimentierung (Radmark et al. 2007, Gerstmeier et al. 2016b). Aus diesen Faktoren und der komplexen Signalkaskade ergeben sich unterschiedliche Möglichkeiten der Inhibition und Regulation dieses Schlüsselenzyms und somit der LT-Biosynthese.

1.2.2.1 Die Interaktion von 5-LO und FLAP

Über die Funktion des Helferproteins FLAP wurde lange Zeit spekuliert. Mit der Entdeckung des bindenden Proteins durch den Inhibitor MK886 im Jahr 1990, von welchem bekannt war, dass dieser die LT-Synthese in zellulären Systemen, jedoch nicht in isolierter 5-LO hemmt (Dixon et al. 1990), wurde FLAP sowohl als Anker für die 5-LO an der Kernmembran als auch als AA-präsentierendes Protein diskutiert (Plante et al. 2006). Letzteres wurde inzwischen aufgezeigt. Das FLAP transportiert die freigesetzte AA zur 5-LO, unterstützt das Enzym in seiner Aktivität und ist an der Metabolisierung von 5-Hydroperoxyeikosatetraensäure (5-HPETE) zu LTA_4 beteiligt (siehe Kapitel 1.2.2.2). Es wird außerdem spekuliert, dass FLAP die Regulation der LT-Synthese über zwei Mechanismen steuert: zunächst geht das FLAP eine lose Verbindung mit der 5-LO ein, die den Transfer von AA ermöglicht und den effizienten Metabolismus vorantreibt. Um die Synthese zu limitieren, bilden das FLAP und die 5-LO einen festen Komplex, der die 5-LO-Reaktion zum Erliegen bringt (Gerstmeier et al. 2016a).

Das integrale Membranprotein FLAP gehört wie die mPGES-1 der MAPEG-Superfamilie an und zeigt daher strukturelle Ähnlichkeiten, besitzt jedoch keine eigene Enzymaktivität (Evans et al. 2008). FLAP ist ein Trimer, dessen jeweilige Monomere aus jeweils vier

Transmembranhelices bestehen, die je durch zwei zytosolische und eine luminale Schleife miteinander verbunden sind (Ferguson et al. 2007) (**Abb. 4**).

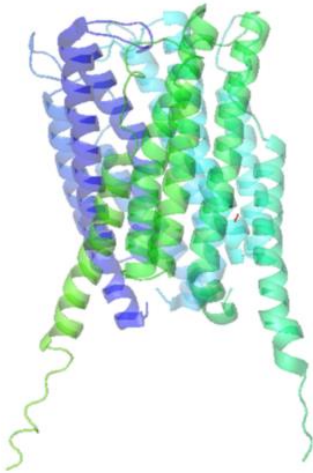


Abb. 4: Kristallstruktur des Trimers FLAP.

Jedes Trimer (blau, cyan, grün) besteht aus je vier Transmembranhelices. Die obere Seite ist in Richtung Zytosol gerichtet, die untere Seite in Richtung Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (Ferguson et al. 2007).

Aufgrund der Bedeutung für das inflammatorische Geschehen bei Asthma und anderen Erkrankungen des Respirationstraktes steht das FLAP schon seit längerer Zeit im Fokus der Forschung. Zudem wird inzwischen vermutet, dass die FLAP-Expression mit dem Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen wie Arteriosklerose korreliert, was das Interesse der Forschung an Inhibitoren dieses Proteins verstärkt hat (siehe Kapitel 1.3.2.2) (Pettersen et al. 2015).

1.2.2.2 Biosynthese der Leukotriene

Nachdem die 5-LO durch Bindung von Ca^{2+} und ATP zur Kernmembran transloziert ist und aktiviert wurde (Jakobsson et al. 1992), bekommt das Enzym sein Substrat (AA), welches durch die cPLA₂ über Hydrolyse der entsprechenden Esterbindung aus der Lipiddoppelschicht der Zellmembran gelöst wurde, vom FLAP präsentiert. Die Reaktion geht in zwei Teilschritten vonstatten. Über Lipidperoxidation wird die prosthetische Gruppe (Fe^{3+}) im aktiven Zentrum zu Fe^{2+} reduziert, wodurch AA der Zutritt ins aktive Zentrum der 5-LO ermöglicht wird (Steinhilber und Hofmann 2014) und die Pentadienstruktur entsprechend positioniert wird. Dort wird durch homolytische Spaltung an C7 ein Radikal gebildet, welches durch Delokalisation der Pentadienstruktur (C5-C9) stabilisiert wird (Radmark et al. 2015). Die Delokalisation ist essentiell für die spätere Sauerstoffanlagerung an C5. Das abgespaltene Wasserstoffatom dissoziiert in ein Elektron und ein Proton. An C5 erfolgt anschließend die Anlagerung zweier Sauerstoffmoleküle, katalysiert durch die 5-LO. Mit der Oxidation von Fe^{2+} zu Fe^{3+} wandert das Elektron zum radikalischen Sauerstoffmolekül, welches dadurch zum Peroxid-Anion wird.

Im letzten Schritt wird dieses Anion protoniert und es entsteht 5-HPETE (Haeggstrom und Funk 2011, Radmark et al. 2015). **Abb. 5** zeigt diese Reaktion schrittweise.

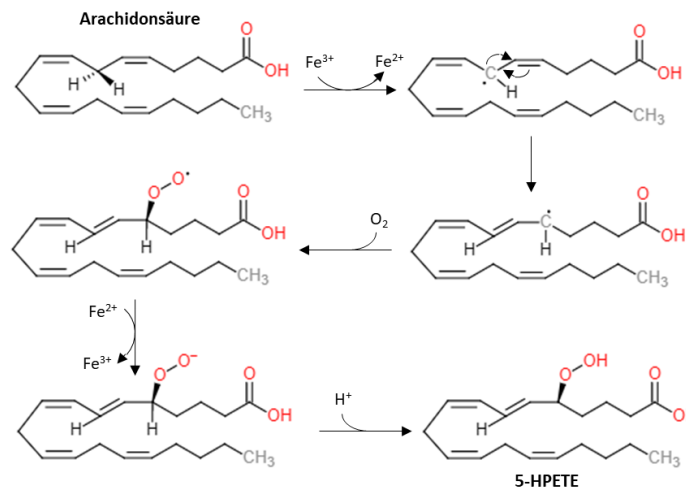


Abb. 5: Metabolisierung von AA zu 5-HPETE durch die 5-LO.

Radikalische Anlagerung von zwei Sauerstoffatomen an C5 über vorangehende Reduktion und nachfolgende Oxidation der prosthetischen Gruppe Fe²⁺/Fe³⁺.

5-HPETE zerfällt anschließend in das instabile Epoxid LTA₄, ebenfalls katalysiert durch die 5-LO. Das Wasserstoffatom an C10 wird dabei vom Enzym abgespalten, es folgt eine radikalische Umlagerung nach C6. Dort reagiert das Radikal mit der Hydroperoxidgruppe von C5 und wird anschließend zu LTA₄ reduziert (Panossian et al. 1982). An diesem Schritt ist zudem das FLAP beteiligt, indem es die Effizienz der Umsetzungsrate zu LTA₄ steigert (Abramovitz et al. 1993, Ferguson et al. 2007). 5-HPETE kann außerdem durch nicht-enzymatische Peroxidierung zu dem entsprechenden Alkohol 5-Hydroxyeicosatetraensäure (5-HETE) reduziert werden.

Das gemeinsame Ausgangssubstrat aller LT ist LTA₄. Abhängig von der jeweiligen Enzymausstattung und dem Stoffwechselangebot der Zelle kann LTA₄ zu weiteren LT metabolisiert werden (**Abb. 6**). Die Synthese von LTB₄ katalysiert die lösliche LTA₄-Hydrolase, ein Zink-enhaltendes Enzym (Penning 2001). Nichtenzymatisch können durch Zerfall von LTA₄ die Fettsäuren 6-trans-LTB₄ und 6-trans-12-epitrans-LTB₄ frei werden (Haeggstrom und Funk 2011). Die Cysteinylleukotriene (Cys-LT) LTC₄, LTD₄ und LTE₄, werden durch Addition des Tripeptids GSH (Glu-Cys-Gly) gebildet (LTC₄). Diese Reaktion katalysiert die LTC₄S (siehe Kapitel 1.2.2.3), ebenfalls ein Mitglied der MAPEG-Superfamilie (Jakobsson et al. 1999b). LTC₄ wird über einen ATP-binding-cassette-Transporter in den Extrazellularraum transportiert (Steinke und Culp 2007) und reagiert dort mit der γ -Glutamyl-S-Transpeptidase unter Abspaltung von Glutaminsäure zu LTD₄, welches weiter über eine Dipeptidase unter Abspaltung von Glycin zu LTE₄ umgesetzt wird (Needleman et al. 1986).

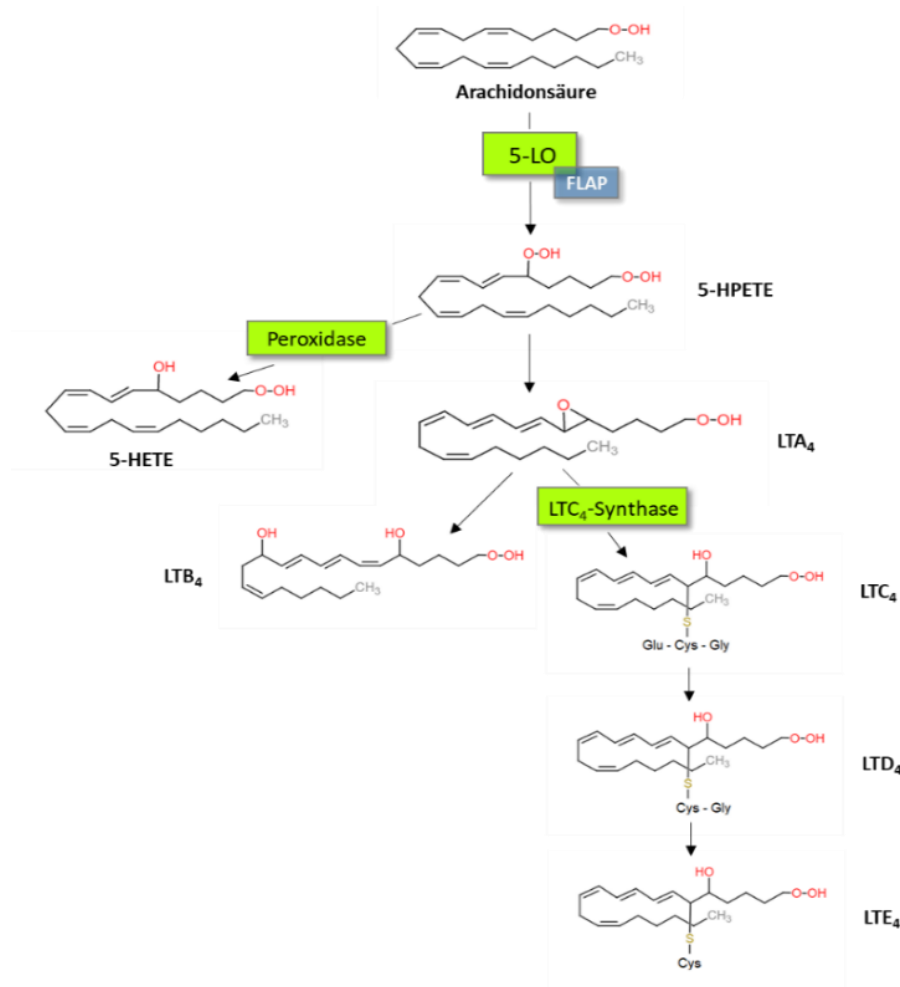


Abb. 6: Übersicht über die LT-Biosynthese.

Die 5-LO katalysiert mit Hilfe von FLAP in zwei Teilschritten die Bildung des instabilen Epoxids LTA₄, als gemeinsames Ausgangssubstrat der LT.

Ihre Wirkung entfalten die LT, wie auch die PG, hauptsächlich über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren: LTB₄ über BLT1/2 und die Cys-LTs über CysLTR1/2 (siehe Kapitel 1.2.3.2) (Peters-Golden und Henderson 2007).

1.2.2.3 LTC₄-Synthase – Schlüsselenzym der Cysteinyleukotrien-Biosynthese

Die LTC₄S als integrales Membranprotein gehört wie das FLAP zur MAPEG-Superfamilie (Jakobsson et al. 1999b) und ist demnach diesem auch strukturell ähnlich. In Interaktion mit dem Substrat LTA₄ wurde das aktive Zentrum der LTC₄S als hufeisenförmiges Gebilde beschrieben, welches die Aktivierung von GSH durch Bindung seiner Thiolgruppe an die nahegelegene AS Arg-104 ermöglicht. Danach wird GSH an das C6-Atom von LTA₄ gekoppelt, Arg-31 übergibt ein Proton zur Bildung einer Hydroxylgruppe an C5, wodurch das Produkt LTC₄ entsteht (Ago et al. 2007, Martinez Molina et al. 2007). Die Zugehörigkeit der LTC₄S zur MAPEG-Superfamilie begründet sich allerdings nur in seiner Enzymfunktion als

GSH-Konjugator. Weitere typische Merkmale anderer MAPEG-Mitglieder werden durch die LTC₄S nicht erfüllt. So zeigt sich die LTC₄S beispielsweise sehr restriktiv in ihrer Substratspezifität (LTA₄), weiterhin konjugiert das Enzym GSH nicht an Xenobiotika, wie andere Mitglieder der MAPEG-Familie (Penrose 1999). Reguliert wird die LTC₄S über Phosphorylierung an Ser-36, wodurch die katalytische Aktivität des Enzyms inhibiert wird (Ahmad et al. 2016).

Das Genom der LTC₄S wurde auf dem Chromosom 5 lokalisiert. Dieses wird in Verbindung mit allergischen und entzündlichen Erkrankungen wie Asthma gebracht, was aufgrund der erhöhten Expression von CysLT im Entzündungsgebiet von Bedeutung für die pharmakologische Forschung ist (siehe Kapitel 1.3.2.3) (Bigby et al. 1996).

1.2.3 Physiologische und pathophysiologische Funktionen der Eikosanoide

Eikosanoide können von jeder Zelle des Körpers synthetisiert werden und spielen als intra- und extrazelluläre LM eine große Rolle bei vielen sowohl physiologischen als auch pathologischen Prozessen. Ihre Wirkung entfalten sie über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. In niedrigen Konzentrationen regulieren sie unter anderem den Blutdruck, die Gerinnung und den Salzhaushalt. Unter inflammatorischen Bedingungen können die Konzentrationen der Eikosanoide stark ansteigen und so die Antwort des Körpers auf pathologische Reize modulieren, beispielsweise über die Regulation von Schmerz, Durchblutung, Schwellung und Fieber. Auch neuronale Erkrankungen wie Alzheimer oder Depressionen sowie Tumorleiden können durch Eikosanoide bzw. deren Inhibitoren beeinflusst werden, weswegen sie einen hohen Stellenwert in der gegenwärtigen Forschung einnehmen (Puppolo et al. 2014, Kalia und Costa 2015).

1.2.3.1 Die Prostanoiden PGE₂, PGD₂ und Thromboxan A₂

Die Wissenschaftler Goldblatt und von Euler beschrieben um 1935 unabhängig voneinander zum ersten Mal die heutigen PG, welche sie aus Prostatasekret isolierten, wo sie durch ihre blutdrucksenkende Wirkung auffielen (Goldblatt 1935, von Euler 1936).

Die am häufigsten gebildeten PG des Körpers sind Prostazyklin und PGE₂. PGE₂ wird in fast allen Organen, besonders in der Nierenrinde und von Immunzellen wie Makrophagen und Monozyten gebildet. In physiologischen Konzentrationen reguliert PGE₂ unter anderem den Blutdruck, die Thrombozytenaggregation und die Nierendurchblutung und hält zudem den Schutz der Magenschleimhaut aufrecht. Unter pathologischen Bedingungen, beispielsweise bei

einer Entzündung, wird PGE_2 verstärkt von Immunzellen gebildet und führt lokal zur Erhöhung der Gefäßpermeabilität und Durchblutung, was in der Entstehung eines Erythems, anschließender Schwellung und letztendlich in einer Gewebszerstörung resultiert (Jakobsson et al. 1999a, Murakami et al. 2000, Trebino et al. 2003). Zusätzlich verstärkt PGE_2 das Schmerzempfinden auf Ebene des peripheren und zentralen Nervensystems und führt so zu einer Hyperalgesie (Ito et al. 2001). Außerdem wird die Fieberentstehung durch Verstellen des Sollwerts im Hypothalamus beeinflusst (Engblom et al. 2003).

PGD_2 wird vornehmlich in Mastzellen aber auch in Makrophagen und dendritischen Zellen gebildet und kann sowohl pro- als auch antiinflammatorische Effekte hervorrufen (Joo und Sadikot 2012). Über den Rezeptor DP_1 wirkt PGD_2 vaso- und bronchodilatorisch sowie als Inhibitor der Thrombozytenaggregation. Gebunden an den Rezeptor DP_2 kommt es zur Chemotaxis von T-Zellen und Granulozyten und damit zu einer verstärkten Entzündungsantwort (Lewis et al. 1982). Im Gehirn ist PGD_2 das häufigste PG und reguliert unter anderem den Schlaf, das Schmerzempfinden und die Körpertemperatur (Roberts et al. 1980).

TXA_2 wird hauptsächlich in Thrombozyten gebildet und führt zu exakt gegensätzlichen Effekten wie Prostazyklin: Vasokonstriktion und Thrombozytenaggregation. Über Bindung an den Rezeptor TP werden Thrombozyten zunächst aktiviert, adhären über verschiedene Rezeptoren, beispielsweise über den von-Willebrandt-Faktor, an subendothelial freiliegendes Kollagen und Fibronectin, sodass schließlich eine Konformationsänderung der Thrombozyten zur Aggregation selbiger führt (Chesterman 1988). Unter physiologischen Bedingungen besteht ein Gleichgewicht zwischen den beiden Gegenspielern TXA_2 und Prostazyklin, welches sich unter pathologischen Umständen jedoch verschieben und die Hämostase dadurch drastisch beeinflussen kann. So führt eine erhöhte Konzentration von Prostazyklin unter Umständen zu lebensbedrohlichen Blutungen, wohingegen zu viel TXA_2 die Thromboseentstehung begünstigt (Ruan et al. 2006). TXA_2 besitzt eine sehr kurze Halbwertszeit von 30 sek und wird hydrolytisch in den inaktiven Metaboliten TXB_2 umgewandelt (Needleman et al. 1976).

1.2.3.2 Leukotriene

Die Assoziation zwischen LT und vielen inflammatorischen Erkrankungen wie Asthma, Arteriosklerose und rheumatoider Arthritis sowie kardiovaskulären Erkrankungen begründet sich in der Einwanderung von Leukozyten in die entzündeten Gebiete. Von den Leukozyten zeigen die Monozyten und Granulozyten die höchste Kapazität, 5-LO-Produkte zu

synthetisieren (Radmark et al. 2007, Gerstmeier et al. 2016a). Neutrophile Granulozyten produzieren dabei nur LTB₄, Eosinophile und Mastzellen hingegen vornehmlich LTC₄. Makrophagen zeigen bezüglich der erzeugten LT keine bestimmte Präferenz (Tian et al. 2014). Damit sind LT an den verschiedensten Abwehrreaktionen und Entzündungsmechanismen wie der Chemotaxis und der Plasmaexsudation beteiligt (Radmark et al. 2015). Außerdem spielen sie eine große Rolle bei allergischen Reaktionen und bei Tumorerkrankungen. Dabei sind LT an der Proliferation und am Überleben von Tumorzellen beteiligt, weshalb die erhöhte Konzentration von LM in Tumorzellen einen wichtigen Ansatz in der Krebsforschung darstellt (Pidgeon et al. 2007, Greene et al. 2011). Seit Kurzem wird auch eine Verbindung zwischen der vermehrten Expression von LT und der Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie diskutiert. Hierbei stellt v.a. die Hemmung der LTB₄-Produktion einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz dar (Tian et al. 2014, Qian et al. 2015).

LTB₄ wirkt stark chemotaktisch auf Leukozyten (Lammermann et al. 2013), bei welchen es die Endotheladhäsion und Extravasation begünstigt. Die Aktivierung der Granulozyten stimuliert zudem die Freisetzung von lysosomalen Enzymen und verstärkt die Bildung von Superoxiden (Samuelsson 1983, Werz und Steinhilber 2006). Durch Aktivierung von Phagozyten, dendritischen Zellen sowie T-Zellen und Anregung von Lymphozyten zur Sekretion von Immunglobulinen (Di Gennaro und Haeggstrom 2012) nimmt LTB₄ eine wesentliche Rolle in der Immunantwort und deren Modulation sowie im Ablauf von allergischen Reaktionen ein (Liu und Yokomizo 2015).

In Mausmodellen zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der LTB₄-Expression und der Entwicklung eines Diabetes mellitus. Hierbei fördert LTB₄ den sterilen Entzündungsvorgang und erhöht so die Anfälligkeit für die Entstehung einer Sepsis bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 (Filgueiras et al. 2015). Bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie wurde außerdem nachgewiesen, dass LTB₄ die Fibroblastenproliferation in der Adventitia der Pulmonalarterien fördert und damit am vaskulären Umbau und dem Fortschreiten der Erkrankung beteiligt ist (Qian et al. 2015). Weiterhin hatte LTB₄ einen Einfluss auf die Entstehung der Arteriosklerose, da in Plaques erhöhte Konzentrationen der 5-LO-Produkte nachgewiesen wurden, welche zur Instabilität der Plaques führten (Poeckel und Funk 2010). Neuere Forschungsergebnisse zeigen zudem die Involvierung von Neutrophilen in die Metastasierung von Tumorzellen, mit der damit verbundenen Möglichkeit, durch Inhibitoren der 5-LO die Metastasierung zu limitieren (Wculek und Malanchi 2015).

Die CysLT (LTC_4 , LTD_4 und LTE_4) führen über ihre ebenfalls G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (CysLT1 und CysLT2), deren Gene sich auf dem X-Chromosom befinden (Lynch et al. 1999), zur Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Chan et al. 1994, Hui und Funk 2002). Der Rezeptor CysLT1 findet sich v.a. an glatten Muskelzellen, in der Lunge und an Leukozyten, CysLT2 hingegen vornehmlich im Herz, im Gehirn und auf Leukozyten (Kanaoka und Boyce 2004). Wie alle G-Protein-gekoppelten Rezeptoren bestehen auch CysLT1 und 2 aus 7 Transmembranhelices. Sie zeigen in ihrer Struktur eine zu ca. 40% identische AS-Sequenz (Haeggstrom und Funk 2011). Dabei weisen die beiden Rezeptoren in den Helices 3 und 7 eine sehr hohe Sequenzhomologie auf, in den Helices 4 und 6 ist sie hingegen vergleichsweise niedrig.

CysLT wirken konstriktiv an glatter Muskulatur; dabei sind v.a. LTC_4 und LTD_4 sehr starke Bronchokonstriktoren (Dahlen et al. 1980). Zudem erhöhen sie die Kapillarpermeabilität durch Kontraktion der Endothelzellen, fördern die Muzinsekretion und hemmen die mukoziliäre Clearance über die Verminderung der Zilienaktivität. Als Entzündungsmediatoren führen sie über Chemotaxis außerdem zur Rekrutierung von Entzündungszellen wie z.B. von Eosinophilen bei Asthma, was sich in erhöhter LT-Produktion zeigt (Hui und Funk 2002). Im kardiovaskulären System haben CysLT einen negativ inotropen Effekt auf das Myokard und vermindern den Blutfluss durch eine Kontraktion der Koronararterien (Roth et al. 1985). In der Ätiogenese der Arteriosklerose spielt nicht nur LTB_4 eine Rolle, sondern auch die Bindung von LTC_4 und LTD_4 an proliferierte Intima und Plaques, was in einer Hyperreagibilität der Endothelzellen resultiert (Allen et al. 1998).

1.3 Pharmakologische Inhibitoren des Arachidonsäure-Stoffwechsels

Die Hemmung der PG- und LT-Synthese stellt seit Jahren das fundamentale Therapiekonzept bei Entzündungen, Fieber und Schmerzen dar. NSAR gehören zu den am häufigsten verschriebenen Medikamenten weltweit. Sie wirken antipyretisch und analgetisch, mit steigender Dosierung kommt eine antiphlogistische Wirkkomponente hinzu. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Inhibitoren sind in **Abb. 7** aufgeführt und werden im Folgenden genauer beschrieben.

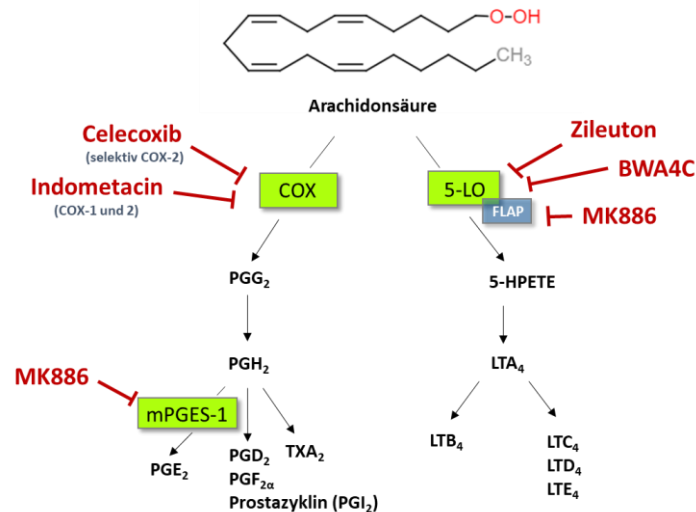


Abb. 7: Angriffspunkte der verwendeten Inhibitoren.

Für die Inhibition der PG-Biosynthese wurde Indometacin als Hemmstoff der COX-1 und COX-2 sowie der selektive COX-2-Inhibitor Celecoxib verwendet. MK886 wurde als dualer Inhibitor der mPGES-1 und des FLAP eingesetzt. Zur Inhibition der LT-Biosynthese kamen als direkte 5-LO-Inhibitoren Zileuton und BWA4C zum Einsatz.

1.3.1 Inhibition der Prostaglandin-Synthese

1.3.1.1 Angriffspunkt COX – selektive und unselektive Inhibitoren

Die COX ist ein membrangebundenes Häm-Protein, welches durch Azetylsalizylsäure (ASS) irreversibel inhibiert wird. Der zugrunde liegende Mechanismus ist die Acetylierung der Hydroxylgruppe von Ser-530 durch ASS, was in einer sehr stabilen Esterbindung *in vivo* und zu einer Konformationsänderung im Enzym führt, wodurch die AA nicht mehr an das aktive Zentrum der COX binden kann (Roth und Majerus 1975, DeWitt et al. 1990). Andere Substanzen wie Ibuprofen, Diclofenac oder Indometacin hemmen die COX-1 und COX-2 reversibel über Bindung an Arg-120, was ebenfalls dazu führt, dass die AA nicht mehr an das aktive Zentrum binden kann (Vecchio et al. 2012).

1938 wurde bekannt, dass die bis dato auf dem Markt verfügbaren NSAR unerwünschte Nebenwirkungen in der Langzeittherapie wie Nieren- und Magenschäden aufweisen, welche auf die unselektive Hemmung der COX-1 und COX-2 zurückzuführen sind (Hawkey 1999). Die „Housekeeping-Funktionen“ der COX-1-Produkte sind essentiell für den Schutz des Magens sowie für die Regulation der Durchblutung der Niere (Khan und Fraser 2012, Patrignani und Patrono 2015). Mit der Entdeckung des Isoenzym COX-2 1991 (Kujubu et al. 1991, Xie et al. 1991) gelang einige Zeit später auch die Entwicklung von COX-2-selektiven Therapeutika, den Coxiben, deren Vorteil die deutlich geringere Gastrototoxizität ist (Khan und

Fraser 2012). Die Selektivität von Coxiben beruht auf dem Austausch der AS Isoleucin gegen Valin in der COX-2, durch die eine kleine Seitentasche im hydrophoben Kanal des aktiven Zentrums entsteht, in welcher die Coxibe andocken können (Simmons et al. 2004). Dies macht die COX-2 100-1000fach affiner für Coxibe als die COX-1 (Everts et al. 2000, Zarghi und Arfaei 2011). Die ersten zugelassenen Substanzen waren die oralen Coxibe Celecoxib und Rofecoxib, welche 1999 auf den Markt kamen (Mendes et al. 2012). Bereits 2004 wurde Rofecoxib jedoch, und kurz darauf auch andere Wirkstoffe dieser Gruppe, aufgrund des erhöhten Auftretens von kardiovaskulären Zwischenfällen und von thromboembolischen Ereignissen vom Markt genommen (Fitzgerald 2004). Diese sind auf das durch die Coxibe entstehende Ungleichgewicht in der Produktion von Prostazyklin und TXA_2 , die im Körper als physiologische Gegenspieler für das hämostatische Gleichgewicht verantwortlich sind, zurückzuführen (Mendes et al. 2012, Bhosale et al. 2015). Durch die verminderte Bildung von Prostazyklin fehlt dem Körper dessen antithrombotische, vasoprotektive und vasodilatorische Wirkung (Koeberle et al. 2016). Heute sind nur noch wenige Coxibe auf dem Markt zugelassen, beispielsweise das parenteral zu verabreichende Parecoxib sowie die oral bioverfügbare Substanz Celecoxib (**Abb. 8 B**), welche auch in der vorliegenden Arbeit als COX-2-Inhibitor verwendet wurde. Von den unselektiven Inhibitoren wurde die Substanz Indometacin (**Abb. 8 A**) verwendet (siehe Kapitel 3.2.7).

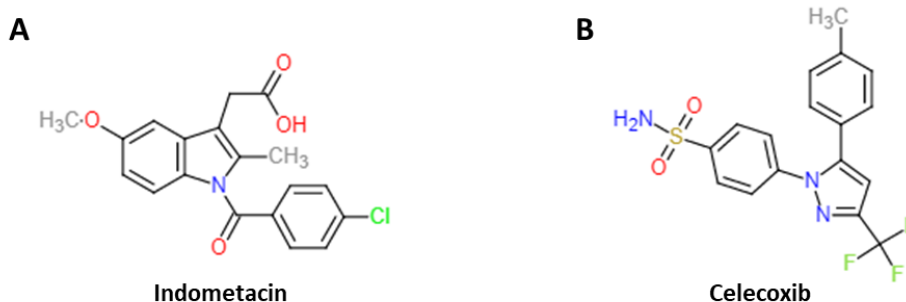


Abb. 8: Strukturformel des unselektiven COX-Inhibitors Indometacin (A) und des selektiven COX-2-Inhibitors Celecoxib (B).

Das Indol-Derivat Indometacin (A) sowie das Pyrazol-Derivat Celecoxib (B) werden in der Leber von CYP2C9 metabolisiert.

1.3.1.2 Angriffspunkt mPGES-1

Durch selektive mPGES-1-Inhibitoren erhoffte sich die Wissenschaft ein besseres kardiovaskuläres Profil auch in Bezug auf Bluthochdruckpatienten, eine spezifischere analgetische Potenz und eine geringere Gastrototoxizität (Xu et al. 2008, Wang und Fitzgerald 2010). Verschiedene mPGES-1-Inhibitoren wurden inzwischen synthetisiert und in Tierstudien

unter inflammatorischen Bedingungen getestet. Die Schwierigkeit dabei war, Substanzen zu finden, die zum einen eine hohe inhibitorische Potenz bezüglich der mPGES-1 zeigen und zum anderen selektiv für dieses Enzym sind. Des Weiteren sollen sie eine geringe Plasmaproteinbindung aufweisen und effizient in Vollblut, sowie möglichst wirksam in Tier und Mensch sein, damit eine *in vivo*-Anwendung durchführbar ist (Koeberle et al. 2016). Der FLAP-Inhibitor MK886 war der erste beschriebene synthetische Inhibitor der mPGES-1 (Mancini et al. 2001). Allerdings weist er eine geringere Potenz gegenüber der mPGES-1 als gegenüber dem FLAP auf und hemmt zudem auch die COX-1 (Koeberle et al. 2009). Alle bisher entwickelten Inhibitoren binden ausnahmslos an das aktive Zentrum des Enzyms, allosterische Inhibitoren sind bisher nicht bekannt. Das Pharmakophor dieser mPGES-1-Inhibitoren besteht aus einem lipophilen Schwanz und einer (polaren) Kopfgruppe, welche entweder negativ geladen ist oder Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden kann (Koeberle et al. 2016).

Mit der Zeit kristallisierte sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* der Nachteil heraus, dass mPGES-1-Inhibitoren in der Schmerztherapie weniger wirksam als COX-Hemmstoffe sind, da die Hyperalgesie nicht nur über PGE₂, sondern auch über andere PG vermittelt wird (Scholich und Geisslinger 2006). Ein weiterer Diskussionspunkt war das Ergebnis, dass das Ausgangssubstrat PGH₂ durch die Inhibition des mPGES-1-Weges vermehrt zu anderen PG umgesetzt wird. Diese Bedenken konnten allerdings inzwischen widerlegt werden. Der Shift zur Synthese anderer PG wirkt sich nicht nachteilig, sondern durch die vermehrte Produktion von Prostazyklin sogar eher positiv auf den Körper, insbesondere auf das kardiovaskuläre Profil, aus (Wang und FitzGerald 2010).

1.3.2 Inhibition der Leukotrien-Synthese

Mit dem Bekanntwerden eines immer größer werdenden Spektrums an Erkrankungen mit Beteiligung von LT, stieg auch die Nachfrage an entsprechend angreifenden Therapeutika. Die Entwicklung von LT-Inhibitoren begann bereits um 1980 (Werz 2007). Es existieren grundsätzlich zwei Möglichkeiten der Hemmung der LT-Biosynthese: (1) die Inhibition von bestimmten Enzymen, was eine verminderte Synthese aller bzw. einiger LT zur Folge hat oder (2) die Blockade von LT-Rezeptoren, wobei LT noch gebildet werden, jedoch nicht am Zielorgan wirken können (Steinke und Culp 2007).

Da in den Stoffwechselweg der LT an mehreren Stellen eingegriffen werden kann (**Abb. 9**) ist die Forschung v.a. an selektiven Hemmstoffen interessiert, um die Nebenwirkungen so gering

wie möglich zu halten. Dabei rückt das Interesse an 5-LO- bzw. FLAP-Inhibitoren wie MK886 sowie selektiven Rezeptor-Antagonisten wie dem kompetitiven CysLT1-Antiasthmikum Montelukast (Lynch et al. 1999) immer mehr in den Mittelpunkt. Jedoch werden auch 5-LO- bzw. FLAP-Inhibitoren inzwischen kontrovers diskutiert, da die 5-LO und das FLAP nicht nur an der Synthese von LT beteiligt sind, sondern auch im Stoffwechsel der physiologisch wichtigen antiinflammatorischen LX eine besondere Rolle einnehmen (Werz et al. 2017). Auch auf die Inhibitoren der LTC₄S werden große Hoffnungen gesetzt (siehe Kapitel 1.3.2.3).

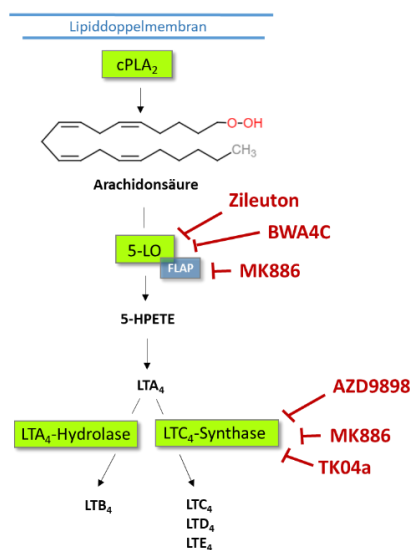


Abb. 9: Inhibitoren der LT-Biosynthese.
Lediglich der direkte 5-LO-Inhibitor Zileuton ist bisher auf dem Markt zugelassen.

1.3.2.1 Angriffspunkt 5-LO

Trotz intensiver Anstrengungen und Recherchen ist bisher nur ein direkter 5-LO-Inhibitor auf dem Markt zugelassen: Zileuton (Steinhilber und Hofmann 2014, Werz et al. 2017). Dieser bindet reversibel an die 5-LO und hemmt dadurch die Synthese von 5-HPETE und LTA₄. Zileuton wird bei Asthma-Patienten bereits seit über 12 Jahren eingesetzt und wirkt antiphlogistisch, antiasthmatisch und antiallergisch. Jedoch zeigt Zileuton in Bezug auf die Effektivität bei rheumatoider Arthritis, Rhinitis und chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen eine geringere Wirkung (Weinblatt et al. 1992, Werz 2007). Nachteilig sind außerdem die kurze Halbwertszeit von drei Stunden und eine sehr hohe Plasmaproteinbindung von 95%, was sehr hohe Dosierungen erfordert (Wertz et al. 2017). Zudem finden sich Interaktionen mit anderen hepatisch zu metabolisierenden Substanzen wie Theophyllin und Warfarin, da auch Zileuton in der Leber über das CYP-System abgebaut wird (Machinist et al. 1995).

Inzwischen werden die direkten 5-LO-Inhibitoren in vier Klassen eingeteilt: (1) Redoxaktive Substanzen, die entweder das zentrale Eisenion reduzieren oder den Redoxstatus der gesamten Zelle verringern, (2) Eisen-Chelat-bildende Inhibitoren mit geringer Redoxaktivität (Bsp. Zileuton), (3) nicht-redoxaktive Substanzen, die kompetitiv mit der AA um die Bindungsstelle konkurrieren und (4) allosterische Inhibitoren, die an der N-terminalen Domäne die stimulierenden Effekte von beispielsweise ATP antagonisieren (Werz et al. 2017).

Unter den redoxaktiven 5-LO-Inhibitoren sind viele pflanzliche Substanzen wie Flavonoide und Coumarine, die den Redoxzyklus der Zelle entkoppeln (Werz 2007). Diese sind hocheffiziente Hemmstoffe der 5-LO, interferieren allerdings auch mit anderen biologischen Redoxsystemen, was zu vielen Nebenwirkungen führt und damit die Markteinführung bisher verhindert hat (McMillan und Walker 1992).

Die Chelatbildung der Eisenliganden-Inhibitoren erfolgt entweder über die Hydroxamsäure-Gruppe (BWA4C) oder die N-Hydroxyurea-Gruppe (Zileuton) (**Abb. 10**).

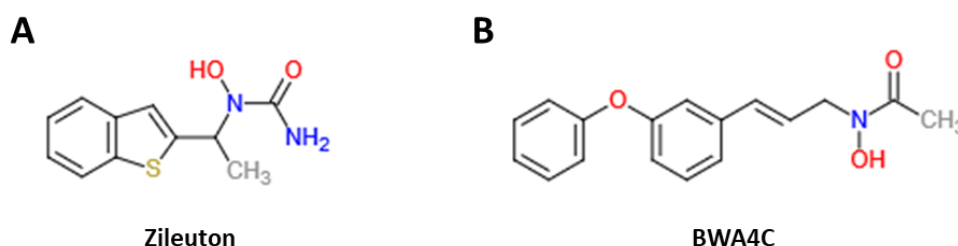


Abb. 10: Strukturformeln der direkten 5-LO-Inhibitoren Zileuton (A) und BWA4C (B).
Diese Inhibitoren gehören zur Gruppe der Eisenliganden-Inhibitoren, sie reduzieren das Eisen im aktiven Zentrum und entkoppeln so den Redoxzyklus der Zelle.

Als nicht-redoxaktive 5-LO-Inhibitoren wurden die Methoxyalkyl-Thiazole bzw. Thiopyranoindole entdeckt. Diese Inhibitoren binden reversibel an die 5-LO und bilden damit einen sogenannten „Dead-End-Komplex“ aus (Falgueyret et al. 1993). Ein Beispiel dafür ist die Substanz RF-Id, ein antiinflammatorisches 1,4-Benzochinon mit zusätzlichen antitumoralen Eigenschaften (Schaible et al. 2014).

Von großem Interesse für die Pharmaindustrie sind auch Phytopharmaka, wie beispielsweise der allosterische 5-LO-Inhibitor Hyperforin. Diese Substanz ist einer der Hauptinhaltsstoffe des Johanniskrauts und wurde zunächst aufgrund ihrer antidepressiven Wirkung erforscht. Inzwischen wurden viele weitere Einsatzgebiete dieser Substanz entdeckt wie z.B. in der Therapie des Morbus Alzheimer (Griffith et al. 2010), von Krebs (Zanoli 2004) sowie von

inflammatorischen Erkrankungen. Hyperforin bindet an die regulatorische N-terminale Domäne (C2-like domain) und beeinflusst dadurch negativ die Translokation und Kernmembranbindung der 5-LO (Albert et al. 2002, Feisst et al. 2009).

1.3.2.2 Angriffspunkt FLAP

FLAP-Inhibitoren hemmen die LT-Synthese auf indirektem Weg, indem sie mit der AA um dieselbe Bindungsstelle am FLAP konkurrieren (Vickers et al. 1992, Gerstmeier et al. 2016a). Sie blockieren die Ausbildung des 5-LO/FLAP-Komplexes an der Kernmembran und somit den Transfer der AA zur 5-LO (Ferguson et al. 2007). Die ersten synthetischen FLAP-Inhibitoren waren MK886 (**Abb. 11 A**), ein Indol (Gillard et al. 1989), und BAY-X1005 (**Abb. 11 B**), ein Chinolin (Muller-Peddinghaus et al. 1993). Etwas später trat die Substanz MK591 (**Abb. 11 C**), ein Hybrid aus Indol und Chinolin (Brideau et al. 1992), in den Fokus der Forschung, jedoch wurden die Studien bei allen drei Substanzen in Phase II bzw. III aus unbekannten Gründen unterbrochen (Werz et al. 2017). Für die Substanz MK591 konnte allerdings die Bindungsstelle am FLAP detektiert werden, welche sich teilweise mit der von AA überlappt, was den kompetitiven Mechanismus erklärt. Dabei scheint die bzw. eine negative Ladung an der AS Asp-62 beteiligt zu sein (Vickers et al. 1992).

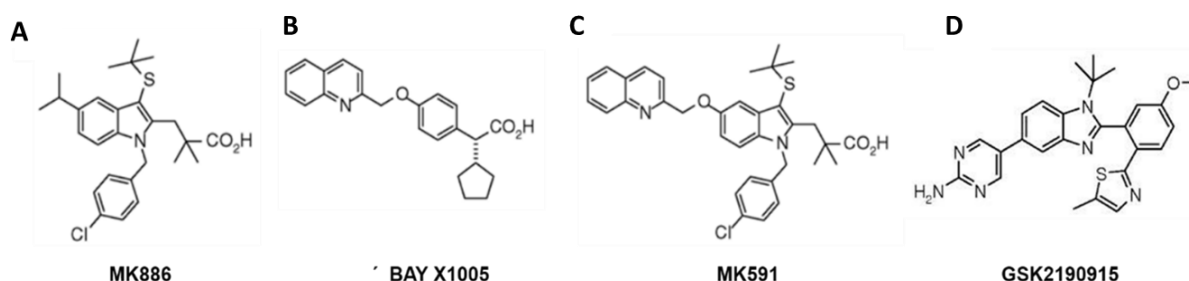


Abb. 11: Strukturformeln der FLAP-Inhibitoren.

Die Inhibitoren A-C konnten die klinischen Untersuchungen der Phase II bzw. III nicht erfolgreich durchlaufen und sind daher auf dem Markt nicht verfügbar. GSK2190915 (D) zeigt jedoch erfolgversprechende Daten in Phase III und ist damit die Substanz, die der Markteinführung momentan am nächsten ist.

In vitro- und *in vivo*-Studien zeigten vielversprechende Therapiemöglichkeiten durch FLAP-Inhibitoren bei entzündlichen Prozessen wie z.B. Asthma, aber v.a. Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen wie Arteriosklerose, Myokardinfarkt oder Schlaganfall könnten von diesen Substanzen profitieren (Pettersen et al. 2015). Die Entdeckung, dass Polymorphismen des Gens für FLAP (ALOX5AP) mit einem erhöhten Risiko für Herzerkrankungen wie Myokardinfarkt oder Koronare Herzkrankheit (KHK) assoziiert sind,

gibt ebenfalls Anlass zur intensivierten Suche und Entwicklung von FLAP-Inhibitoren (Huang et al. 2010).

Inzwischen liegt die Hoffnung auf einem neuen Wirkstoff: GSK-2190915 (syn. Fibroflapon) (**Abb. 11 D**). Dieser hat die Phase II der klinischen Untersuchung an Asthma-Patienten erfolgreich durchlaufen und zeigt vielversprechende Daten in der Phase III (Snowise et al. 2013, Kent et al. 2014).

1.3.2.3 Angriffspunkt LTC₄-Synthase

Aufgrund der erhöhten Expression von CysLT im Entzündungsgebiet stellt die Inhibition dieser LT einen weiteren Angriffspunkt in der antiinflammatorischen Therapie dar. Mit den etablierten CysLT-Rezeptorantagonisten (Bsp. Montelukast, Zafirlukast) ist es pharmakologisch bereits möglich, die proinflammatorischen LT in ihrer Wirkung zu mindern. Favorisiert wird allerdings die Inhibition der LTC₄S, wodurch die CysLT-Synthese auf einer früheren Stufe gehemmt wird. Inhibitoren dieses Enzyms werden intensiv gesucht, sind allerdings bisher nicht auf dem Markt zugelassen. Zum einen erschwert die hohe Sequenz- und Strukturhomologie der MAPEG-Mitglieder die Entwicklung spezifischer Inhibitoren, zum anderen stellt sich die Isolierung des integralen Membranproteins, aber auch die Durchführung der Versuche als schwierig dar, was unter anderem der Instabilität des Substrats der LTC₄S (LTA₄) mit einer Halbwertszeit von ~14 sek geschuldet ist (Liening et al. 2016).

Mit der Entschlüsselung der Kristallstruktur der LTC₄S und der Identifizierung der an der Aktivierung von GSH beteiligten AS Arg-104 und Arg-31 (Ago et al. 2007, Martinez Molina et al. 2007) wurde die Entwicklung, wenn auch weniger Substanzen, mit einem Angriffspunkt an der LTC₄S vereinfacht (Ago et al. 2013, Kleinschmidt et al. 2015). Für die Substanz TK04a (Kleinschmidt et al. 2015) wurden in einer neu entwickelten Versuchsreihe sehr niedrige Werte (i.E. IC₅₀ = 50 nM) ermittelt (Liening et al. 2016). Dies stellt damit im Vergleich zu den ersten LTC₄S-Inhibitoren (Bsp. Helenalin, Thymoquinon) mit IC₅₀-Werten von > 10 µM (Tornhamre et al. 2001, Mansour und Tornhamre 2004) einen großen Erfolg dar. Auch die Erkenntnis, dass die Blockade der LTC₄S mit einer vermehrten Synthese des antiinflammatorischen LXA₄ einhergeht, führten aufgrund der pharmakologischen Relevanz dieses Effekts zur weiteren Analyse dieser Substanz (Kleinschmidt et al. 2015, Liening et al. 2016).

In Großbritannien wurden Ende 2017 große Hoffnungen auf die Substanz AZD9898 gesetzt. Nach erfolgversprechenden Versuchen *in vitro* und *in vivo* startete die Substanz kürzlich als Antiasthmatikum in die Phase I der klinischen Untersuchung (Glader et al. 2017). Aufgrund

der vorzeitigen Beendigung dieser Untersuchungen aus unbekannten Gründen bleibt die Suche nach potenten und selektiven LTC₄S-Inhibitoren jedoch weiterhin bestehen.

1.3.3 Duale Inhibitoren des Arachidonsäurestoffwechsels

Da im Entzündungsprozess die Konzentration von LT und PG stark ansteigt, entstand das Konzept, mit geringen Dosen ausgewählte Schlüsselenzyme beider Signalkaskaden so zu hemmen, dass die physiologisch relevanten Funktionen der Metabolite dabei trotzdem erhalten bleiben. So stehen in der Therapie inflammatorischer Erkrankungen Substanzen, die sowohl den COX- als auch den 5-LO-Weg hemmen, momentan besonders im Fokus der Forschung als eine vielversprechende Alternative zu den NSAR (Meirer et al. 2014). Von diesen Substanzen verspricht man sich geringere Nebenwirkungen bei erhöhter Effektivität (Koeberle et al. 2016). In der PG-Kaskade stehen dabei v.a. die COX-2 und mPGES-1 im Mittelpunkt, in der LT-Kaskade werden v.a. das FLAP und die 5-LO als Targets favorisiert. Ein Vorteil der dualen 5-LO/COX-Inhibitoren ist die Inhibition der LT-vermittelten Entzündung, die durch PG weiter gesteigert wird (Leone et al. 2007). Zudem entsteht bei der Blockade nur eines Weges des AA-Metabolismus eine Verschiebung des Gleichgewichts zur Synthese der anderen Mediatoren, da die Menge des Ausgangssubstrates gleichbleibend ist (Hwang et al. 2013).

Seit über 20 Jahren wird an Substanzen, die diesem Konzept entsprechen, bereits intensiv geforscht, mit immer anderen Kombinationen von Enzymen, die inhibiert werden. Das erste auf dem Markt verfügbare Präparat war Benoxaprofen, ein COX-2/5-LO-Inhibitor, welchem allerdings nach dem Auftreten von starken allergischen Reaktionen und toxischen Leberschäden mit Todesfolge die Zulassung wieder entzogen wurde (Knights et al. 1986). Ein weiterer der ersten dualen Inhibitoren ist MK886, der neben dem FLAP auch die mPGES-1 hemmt (siehe Kapitel 1.3.1.2 und 1.3.2.2). Auch der pflanzliche 5-LO-Inhibitor Hyperforin zeigt hemmende Effekte auf die COX-1 und zählt damit zu den dualen Inhibitoren (Albert et al. 2002). Ein weiterer sehr vielversprechender Wirkstoff ist Licofelone (syn. ML 3000), ein dualer COX/FLAP-Inhibitor, der bis in die Phase III der klinischen Studien zur Behandlung der Osteoarthritis getestet wurde und damit bis dato der am weitesten entwickelte duale Inhibitor ist. Er vereint starke analgetische, antiphlogistische und antithrombotische Wirkungen und weist geringere gastrointestinale Nebenwirkungen als die NSAR auf (Fischer et al. 2007, Koeberle und Werz 2018). Mit der potenten Inhibition der COX-1 ($IC_{50} = 0,1 \mu M$) sowie der mPGES-1 ($IC_{50} = 6 \mu M$) ist Licofelone ebenso wirkungsvoll wie der anerkannte duale Hemmstoff MK886 (Koeberle et al. 2008).

1.4 Phytotherapeutika aus Sri Lanka in der antiinflammatorischen Therapie

Pflanzen sind seit Jahrtausenden eine essentielle Quelle der Volksmedizin und der pharmakologischen Therapie verschiedenster Erkrankungen. Aufgrund ihrer hohen Sicherheit, Effektivität und günstigen Kosten sind sie auch heute in der Forschung sehr gefragt. Zudem weisen pflanzliche Wirkstoffe ein oft geringeres Nebenwirkungsspektrum auf als die heute verfügbaren synthetisch hergestellten Arzneimittel (Koeberle und Werz 2018). Vor allem als Alternative zur Glucocorticoid- und NSAR-Therapie finden Phytotherapeutika als Analgetika und Antiphlogistika Zuspruch in der Bevölkerung. Lange bewährt haben sich dabei beispielsweise Präparate auf der Basis von Teufelskralle-, Brennessel- und Weidenrindenextrakten.

In der vorliegenden Arbeit wurden vier Pflanzen aus Sri Lanka auf ihre antiinflammatorische Wirkung hin untersucht: *Garcinia cambogia* (GC), *Pothos scandens* (POT), *Nyctanthes arbor-tristis* (SF) und *Plectranthus zeylanicus* (PL). Diese wurden in einer Kooperation mit der Universität in Ruhuna auf Sri Lanka von Mayuri Napagoda (Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Ruhuna, Galle 80 000, Sri Lanka) gesammelt und mit Extraktionsmitteln unterschiedlicher Polarität (Hexan, Dichlormethan (DCM), Ethylacetat (EtOAc) und Methanol (MeOH)) extrahiert (**Tab. 1**). Anschließend wurde das Extraktionsmittel verdampft, die Extrakte getrocknet, um dann in Dimethylsulfoxid (DMSO) [0,1%] für die Experimente gelöst zu werden.

Tab. 1: Übersicht über die Pflanzenextrakte aus Sri Lanka mit den entsprechenden Extraktionsmitteln.

Pflanze	Abkürzung	Extraktionsmittel
<i>Garcinia cambogia</i>	GC-1	Hexan
	GC-2	DCM
	GC-3	EtOAc
	GC-4	MeOH
<i>Pothos scandens</i>	POT-1	Hexan
	POT-2	DCM
	POT-3	EtOAc
	POT-4	MeOH
<i>Nyctanthes arbor-tristis</i>	SF-1	Hexan
	SF-2	DCM
	SF-4	MeOH
<i>Plectranthus zeylanicus</i>	PL-7	Hexan
	PL-8	DCM
	PL-17	DCM
	PL-18	DCM
	PL-19	DCM
	PL-20	DCM

1.4.1 *Garcinia cambogia*

Die in Südostasien und Westafrika beheimatete immergrüne Pflanze *Garcinia cambogia* (syn. Malabar-Tamarinde) wird bis zu 12 m hoch und trägt Kürbis-ähnliche Früchte, welche je 6-8 Samen beinhalten (Abb. 12). Sie gehört zur Familie der *Clusiaceae* und blüht von März bis Mai rotorange (Semwal et al. 2015). In Asien wird die Pflanze seit langem in der Therapie von entzündlichen Darmerkrankungen, Rheuma und in der



Abb. 12: *Garcinia cambogia*. Baum, Frucht und Blüte (Semwal et al. 2015).

Augenheilkunde eingesetzt (Semwal et al. 2015). Bewiesen ist die verminderte Expression von Entzündungsmarkern in Gehirn, Niere und Serum in Tierversuchen durch den Pflanzenextrakt, was die antiinflammatorische Hypothese bestätigt (Clouatre und Preuss 2013). Zudem werden

der Pflanze antidiabetische, antitumorale und antiparasitäre sowie leber- und magenprotektive Wirkungen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zugesprochen (Semwal et al. 2015). Die Pflanzeninhaltsstoffe sollen außerdem eine Körpergewichtsreduktion bewirken. Durch den Hauptinhaltsstoff der Frucht und Rinde, die Hydroxyzitronensäure, soll die de-novo Fettsäuresynthese vermindert, die hepatische Glykogensynthese verstärkt und der Appetit gezügelt werden (Kim et al. 2013). Zudem wurden antiulzerogene Effekte nach Schädigung der Magenschleimhaut mit Indometacin *in vivo* nachgewiesen (Mahendran et al. 2002). Jedoch ist ihre unbedenkliche Anwendung aus toxikologischer Sicht noch nicht bestätigt (Rasha et al. 2015).

1.4.2 *Pothos scandens*

Die essbare Kletterpflanze *Pothos scandens* (Abb. 13) findet sich hauptsächlich in den feuchten Regionen Südasiens. Dort klettert sie vornehmlich an Felsen, Wänden und Baumstämmen bis zu 6 m empor. Sie gehört zur Familie der einkeimblättrigen *Araceae* (Aronstabgewächse) und trägt scharlachrote Früchte in Beerenform (Boyce 2009, Mohan und Maruthupandian 2010).



In der Medizin werden jedoch nur die Blätter und Wurzeln der Pflanze verwendet. Die darin enthaltenen Inhaltsstoffe zeigen eine antiinflammatorische, antiarthritische und antioxidative Wirkung. *Pothos scandens* ist in der Lage, allergische Reaktionen vom Soforttyp über die Hemmung der Mastzelldegranulation zu inhibieren und weist damit großes Potential in der Asthma-Therapie auf (Gupta et al. 2013). In Indien werden die Blätter effektiv zur Behandlung von Schlangenbissen eingesetzt, auf Sri

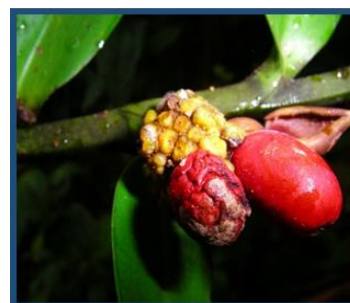


Abb. 13: *Pothos scandens*.
Pflanze und Frucht
(Boyce 2009).

Lanka zur Therapie von Schwellungen und Verbrennungen (Haneefa et al. 2010, Kim et al. 2017). Außerdem findet die Pflanze Einsatz bei Fieber, Malaria, Krebs und verschiedensten Infektionen (Kim et al. 2017).

1.4.3 *Nyctanthes arbor-tristis*

Der ursprünglich aus Indien stammende Baum *Nyctanthes arbor-tristis* (syn. Nachtjasmin) hat sich inzwischen über viele Regionen Südasiens ausgebreitet. Er gehört zur Familie der *Oleaceae* und wird bis zu 10 m hoch. Er bildet duftende kleine 5-8-blättrige Blüten mit einem

orangefarbenen Zentrum aus (Abb. 14). Als Früchte trägt der Baum kleine Kapseln, welche je 2 Samen enthalten (Kakoti et al. 2013).



Abb. 14: *Nyctanthes arbor-tristis*. Blüte, Baum und Frucht (Sah und Verma 2012).

Seit langem werden die Blätter und die Rinde zu Medizin verarbeitet, welche bei Ischias-Schmerz, Fieber, Rheuma und Malaria helfen sollen (Saxena et al. 1987). Außerdem finden die Blätter Anwendung bei Bluthochdruck, Diabetes und als Antidot bei Schlangenbissen (Sah und Verma 2012). Pharmakologische Untersuchungen bewiesen die antiinflammatorische und antipyretische sowie antivirale und antiparasitäre Wirkung von Extrakten dieser Pflanze (Puri et al. 1994, Agrawal und Pal 2013). Nachteilig zeigte sich jedoch *in vivo* an Ratten die Ausbildung von Magenulcera bei oraler Gabe (Saxena et al. 1987). Die Toxizität der Pflanze auf den Organismus wird kontrovers diskutiert.

1.4.4 *Plectranthus zeylanicus*

Das Staudengewächs *Plectranthus zeylanicus* (Abb. 15) (syn. *Coleus zeylanicus*, lokal Iruveriya) gehört zur Familie der *Lamiaceae* (Lippenblütler) und wird sehr häufig in der traditionellen Volksmedizin eingesetzt. Die Pflanze wird bis zu 1,5 m hoch und ist endemisch auf Sri Lanka, wurde allerdings auch nach Südindien eingeführt, wo sie als Kraut in Gärten kultiviert wird (Lukhoba et al. 2006). Der Saft ihrer Blätter bzw. Stängel wird zur Therapie unterschiedlicher Darmerkrankungen wie Ulzera, Diarrhoe,



Abb. 15: *Plectranthus zeylanicus* (Napagoda et al. 2014).

Übelkeit und Verdauungsstörungen verwendet, findet aber auch bei der Hämophilie, Dermatitis, Fieber und Husten Anwendung. Außerdem stellt *Plectranthus zeylanicus* ein Antidot gegen Tarantelbisse dar (Napagoda et al. 2014). Die Erkenntnis, dass lipophile Extrakte

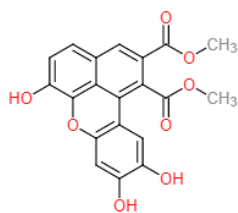
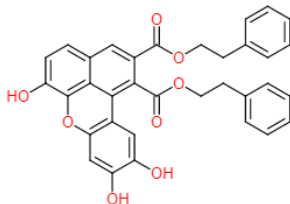
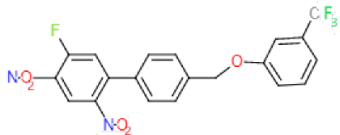
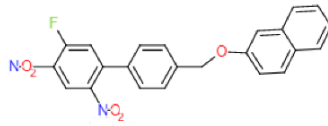
dieser Pflanze die 5-LO potent inhibieren, ohne toxisch auf Zellen zu wirken, lässt in *Plectranthus zeylanicus* ein vielversprechendes antiinflammatorisches Phytopharmakon vermuten, was jedoch weiterer Forschung bedarf (Napagoda et al. 2014). Auch antimikrobielle Wirkungen der Pflanze wurden inzwischen entdeckt, sowohl gegen grampositive als auch gramnegative Bakterien (Napagoda et al. 2017).

1.5 Duale mPGES-1/LTC₄-Synthase-Inhibitoren

Die Testsubstanzen CTA1, CTA2, SZK1 und SZK5 (**Tab. 2**), welche im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit näher charakterisiert wurden, wurden nach Docking-Studien im Labor synthetisiert. Die Zielstellung hierbei war die Hemmung der mPGES-1, zusätzlich waren kleine Moleküle und eine möglichst einfache Synthese gewünscht (Di Micco et al. 2018). Dazu wurde aufgrund der aromatischen Gruppen wie Phe-44, His-53 und Tyr-130 im aktiven Zentrum der mPGES-1 (Lauro et al. 2016) ein Brombenzol als Basisstruktur gewählt, welche mit weiteren funktionellen Gruppen versehen wurde. Durch *in silico*-Verfahren und Analyse der Docking-Ergebnisse blieben zwei Grundgerüste übrig, welche im weiteren Verlauf durch verschiedene funktionelle Gruppen ergänzt wurden. Dies führte schließlich zu den Testsubstanzen SZK1 und SZK5, welche über die 1-Fluoro-2,4-Dinitro-Struktur eine Interaktion mit Arg-52, His-53 und Ser127 des aktiven Zentrums der mPGES-1 eingehen (Di Micco et al. 2018).

In weiteren Untersuchungen bezüglich der Effekte auf die mPGES-1 wurden durch Vincenza Cantone (Department of BioMedical and Pharmaceutical Sciences, Università degli Studi di Salerno, 84084 Fisciano SA, Italien) IC₅₀-Werte im unteren einstelligen µM-Bereich ermittelt (Di Micco et al. 2018). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der mPGES-1 zu den anderen MAPEGs wurde auf eine zusätzliche Hemmwirkung der Substanzen auf die LTC₄S getestet (durchgeführt von Stefanie Liening, Mitarbeiterin am Institut für Pharmazie, Friedrich-Schiller-Universität Jena), mit ähnlich erfolgsversprechenden Ergebnissen (**Tab. 2**). Nach diesen positiven Befunden sollten die Substanzen nun im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf ihre Effekte auf weitere Enzyme des AA-Stoffwechsels sowie hinsichtlich ihrer Zytotoxizität untersucht werden.

Tab. 2: IC_{50} -Werte dualer mPGES-1/LTC₄S-Inhibitoren am isolierten Enzym.

	Struktur	mPGES-1 (i.E.)	LTC ₄ S (i.E.)
CTA1		3.40 μ M	3.81 μ M
CTA2		0.63 μ M	0.47 μ M
SZK1		0.25 μ M	1.68 μ M
SZK5		0.18 μ M	0.93 μ M

Die Testsubstanzen weisen durch ihre Ringsysteme und die bei SZK1 und SZK5 vorliegende Halogenierung eine sehr hohe Lipophilie auf. Dies bedingt eine hohe Plasmaproteinbindung (v.a. an Albumin), was eine höhere Dosierung in zellulären Systemen erfordert. SZK1 ist die lipophilste der vier Substanzen, gefolgt von SZK5, was durch Fluor als Substituenten bedingt ist. CTA2 ist hingegen weniger lipophil als SZK1 und SZK5, jedoch lipophiler als CTA1, was sich durch die zusätzlichen beiden aromatischen Benzolringe in CTA2 begründen lässt. Damit ist jedoch eine verringerte Membrangängigkeit verbunden.

2. ZIELE DER ARBEIT

Seit Jahrzehnten sind die NSAR trotz ihrer Nebenwirkungen bei Langzeiteinnahme das Mittel der Wahl in der Schmerz- und Entzündungstherapie. Die Wissenschaft forscht daher seit langem an Wirkstoffen mit geringerem Nebenwirkungsprofil, jedoch schafften es bisher nur wenige der neu synthetisierten Substanzen auf den Markt. Die Nebenwirkungen sind nur eine Problematik, die sich bei der Entwicklung antiinflammatorischer Wirkstoffe auftut. Eine andere Schwierigkeit ist die verminderte Wirksamkeit in Vollblut bzw. *in vivo*, was unter anderem auf die hohe Plasmaproteinbindung einiger dieser Substanzen zurückzuführen ist. Trotz der vielversprechenden Fortschritte in der Entwicklung von synthetischen Substanzen ist das Interesse an entsprechend wirksamen Phytopharmaka ebenfalls sehr groß.

Vor diesem Hintergrund lag der Fokus der vorliegenden Arbeit auf der Charakterisierung solcher neuer synthetischer und pflanzlicher Wirkstoffe, mit dem Ziel, Substanzen zu finden, die aufgrund einer selektiven und potenten Inhibition spezifischer Enzyme des AA-Stoffwechsels im Vergleich zu den herkömmlichen NSAR nur geringe Nebenwirkungen aufweisen. Hierfür wurden verschiedene Pflanzenextrakte bzw. synthetische Substanzen untersucht, wobei folgende Punkte im Vordergrund standen:

1. Erfassung des inhibitorischen Potentials von Pflanzenextrakten auf die 5-LO-Aktivität in PMNL und am isolierten Enzym.
2. Untersuchung der Pflanzenextrakte auf deren Einfluss auf die PG-Biosynthese durch Hemmung der mPGES-1.
3. Untersuchung der synthetischen dualen mPGES-1/LTC₄S-Inhibitoren auf ihre Zytotoxizität.
4. Untersuchung der synthetischen dualen mPGES-1/LTC₄S-Inhibitoren auf die 5-LO-Produktbildung im isolierten Enzym und in zellulären Systemen (PMNL, Monozyten und Vollblut) mit Ermittlung der jeweiligen IC₅₀-Werte.
5. Untersuchung der synthetischen dualen mPGES-1/LTC₄S-Inhibitoren auf ihr inhibitorisches Potential hinsichtlich der COX-1 und COX-2 durch Quantifizierung der PG-Biosynthese.
6. Untersuchung der synthetischen dualen mPGES-1/LTC₄S-Inhibitoren auf die Beeinflussung der 5-LO- und FLAP-Protein-Protein-Interaktion.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

Standardchemikalien und Materialien wurden, sofern nicht anders deklariert, über Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, DE), Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE), AppliChem GmbH (Darmstadt, DE), Cayman Chemical Biomol GmbH (Hamburg, DE) oder Fisher Scientific (Schwerte, DE) bezogen.

3.1.1 Zellen und Blutprodukte

Name	Bezugsquelle
Leukozytenkonzentrate (human)	Transfusionsmedizin (Jena, DE)
A549-Zellen	ATCC (Molsheim Cedex, FR)
Heparin-Vollblut (human)	Transfusionsmedizin (Jena, DE)

3.1.2 Enzyme

Name	Konzentration	Bezugsquelle
COX-1 (vom Rind)	50 U/ml	Cayman Chemical Bertin Pharma (Montigny le Bretonneux, FR)
COX-2 (human, rekombinant)	20 U/ml	Cayman Chemical Bertin Pharma (Montigny le Bretonneux, FR)
5-LO (human, rekombinant)		Karolinska-Institut (Solna, SW)

3.1.3 Kontrollinhibitoren

Name	Konzentration	Bezugsquelle
BWA4C	0,1 μ M	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Celecoxib	1 μ M	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Indometacin	10 μ M	Cayman Chemical Bertin Pharma (Montigny le Bretonneux, FR)

MK886	1, 3, 10 μ M	Cayman Chemical Bertin Pharma (Montigny le Bretonneux, FR)
Staurosporin	1 μ M	Calbiochem (San Diego, CA, USA)
Zileuton	3 μ M	Carbosynth (Berkshire, UK)

3.1.4 Puffer und Lösungen

Name	Konzentration	Bezugsquelle
Amplifikationsansatz	8 μ l amplification stock + 0,5 μ l Polymerase + 31,5 ml MilliQ-Wasser	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE) Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
DMSO	100%	Merck (Darmstadt, DE)
DMEM-Medium	10% bzw. 2% FCS + 100 U/ml Penicillin + 0,1 μ g/ml Streptomycin	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE) Peptotech (Hamburg, DE) Peptotech (Hamburg, DE)
Dulbecco's PBS	9,55 g/l, pH 7,4	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Elutionspuffer	50 mM KPI-Puffer + 50 mM ATP + 1 mM EDTA	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE) AppliChem (Darmstadt, DE)
EtOH	16,70%	Grüssing GmbH (Filsum, DE)
Histopaque®-1077		Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Homogenisierungs- puffer (Homog.-Puffer)	0,1 mM KPI pH 7,4 + 250 mM Saccharose + 100 mM PMSF + 6 mg/ml STI + 1 mg/ml Leupeptin + 2,5 mM GSH	Applichem (Darmstadt, DE) Sigma-Aldrich (Steinheim, DE) Sigma-Aldrich (Steinheim, DE) Sigma-Aldrich (Steinheim, DE) AppliChem (Darmstadt, DE)
IPTG-Lösung	3,2 ml/l	AppliChem (Darmstadt, DE)
KPI-Puffer	0,2 M KH ₂ PO ₄ + 0,2 M Na ₂ HPO ₄ , pH 7,4	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
LB-Medium	5 g Hefeextrakt + 10 g Pepton + 5 g NaCl + 1 ml NaOH [1 M] 1000 ml MilliQ-Wasser, pH 7,2	Fisher Scientific (Schwerte, DE) Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE) Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE)

Ligationsansatz	8 µl ligation stock + 1 µl Ligase + 31 ml MilliQ-Wasser	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE) Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Lysispuffer	50 ml Homog.-Puffer (50 ml TEA [1 M], pH 8 + 25 ml EDTA [0,2 M] auf 1000 ml MilliQ-Wasser) + 25 mg Lysozym + 6 mg/ml STI + 100 mM PMSF + 2 M DTT	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE) AppliChem (Darmstadt, DE) Cayman Chemical Bertin Pharma (Montigny le Bretonneux, FR) Sigma-Aldrich (Steinheim, DE) Sigma-Aldrich (Steinheim, DE) VWR International (Darmstadt, DE)
MeOH	100%, 25%	Fisher Scientific (Schwerte, DE)
PBS-CaCl ₂	PBS pH 7,4 +1 mM CaCl ₂	GE Healthcare Life Science (Freiburg, DE)
PBS-Dextran-Puffer	PBS pH 7,4 + 5% Dextran	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
PBS-EDTA	PBS pH 7,4 + 1 mM EDTA	AppliChem (Darmstadt, DE)
PBS-Glc-Puffer	PBS pH 7,4 + 0,1% Glucose	Cayman Chemical Bertin Pharma (Montigny le Bretonneux, FR)
PBS-HCl-Puffer	PBS pH 7,4 + 1 N HCl	Grüssing GmbH (Filsum, DE)
PGH ₂ -Puffer	0,1 mM KPI pH 7,4 + 100 mM PMSF + 6 mg/ml STI + 1 mg/ml Leupeptin + 2,5 mM GSH	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE) Sigma-Aldrich (Steinheim, DE) Sigma-Aldrich (Steinheim, DE) AppliChem (Darmstadt, DE)
Puffer A	1 Beutel Duolink® Puffer A in 1 l MilliQ-Wasser	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Puffer B	1 Beutel Duolink® Puffer B in 1 l MilliQ-Wasser	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)

RPMI 1640-Medium	5% bzw. 10% FCS + 100 U/ml Penicillin + 0,1 µg/ml Streptomycin + 1 mM L-Gln + (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE) Peprotech (Hamburg, DE) Peprotech (Hamburg, DE) BioChem GmbH (Karlsruhe, DE) GE Healthcare Life Science (Freiburg, DE)
SDS-Lysispuffer	10% SDS + 20 mM HCl, pH 4,5	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE) Grüssing GmbH (Filsum, DE)
Stopp-Lösung	40 mM FeCl ₂ + 80 mM Citronensäure + 10 mg/ml 11β-PGE ₂ + 2865 ml MilliQ-Wasser	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE) Merck (Darmstadt, DE) Cayman Chemical Bertin Pharma (Montigny le Bretonneux, FR)
Tris-Puffer	100 mM Tris, pH 8 +5 mM GSH + 5 µM Hämoglobin	AppliChem (Darmstadt, DE) AppliChem (Darmstadt, DE) Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Trypsin/EDTA	5 mg/ml Trypsin + 2,2 mg/ml EDTA	Fisher Scientific (Schwerte, DE) AppliChem (Darmstadt, DE)

ATP (Adenosintriphosphat), DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), DMSO (Dimethylsulfoxid), DTT (Dithiothreitol), EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure), EtOH (Ethanol), FCS (fetales Kälberserum), GSH (Gluthation), IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid), KPI (Kalium-Phosphat-Puffer), LB (Lysogeny broth), MeOH (Methanol), PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung), PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid), RPMI (Roswell Park Memorial Institute), SDS (Natriumdodecylsulfat), STI (Trypsin-Inhibitor), TEA (Triethanolamin)

3.1.5 Sonstige Chemikalien

Name	Konzentration	Bezugsquelle
11β-PGE ₂	10 mg/ml in MeOAc	Cayman Chemical Bertin Pharma (Montigny le Bretonneux, FR)
A23187	2,5 µM, 30 µM	Cayman Chemical, Biomol (Hamburg, DE)
AA	2, 5, 20 µM	Cayman Chemical, Biomol (Hamburg, DE)
Acetonitril	30%	Fisher Scientific (Schwerte, DE)
Ampicillin	0,1 mg/ml	AppliChem (Darmstadt, DE)
CaCl ₂	0,4 M	GE Healthcare Life Science (Freiburg, DE)

Citronensäure	80 mM	Merck (Darmstadt, DE)
Duolink® In situ Detection Reagents Far Red		Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Duolink® In Situ Mounting Medium with DAPI		Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Duolink® In situ PLA Probe (anti mouse, anti rabbit)		Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
FeCl ₂	40 mM	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
FeSO ₄	0,01 mM	AppliChem (Darmstadt, DE)
GSH	2,5 und 5 mM	AppliChem (Darmstadt, DE)
IL-1 β	1 ng/ml	Cayman Chemical Bertin Pharma (Montigny le Bretonneux, FR)
Leupeptin	1 mg/ml in PBS, pH 7,4	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
MgSO ₄	2 mM	AppliChem (Darmstadt, DE)
MTT	5 mg/ml in PBS, steril	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
PFA	4% in PBS, pH 7,4	Fisher Scientific (Schwerte, DE)
PGB1	200 ng	Cayman Chemical, Biomol (Hamburg, DE)
PGH ₂	60,4 nmol in Aceton	Larodan Fine Chemicals (Stockholm, SWE)
PMFS	100 mM in EtOH	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Saccharose	0,25 M	Applichem (Darmstadt, DE)
STI	6 mg/ml in PBS, pH 7,4	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
TFA	0,01%	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Triton	0,25% in PBS, pH 7,4	Cayman Chemical Bertin Pharma (Montigny le Bretonneux, FR)

A23187 (Calcium-Ionophor), AA (Arachidonsäure), DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol), EtOH (Ethanol), GSH (Gluthation), IL-1 β (Interleukin-1 β), MeOAc (Methylacetat), MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid), PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung), PFA (Paraformaldehyd), PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid), STI (Trypsin-Inhibitor), TFA (Trifluoressigsäure)

3.1.6 Verbrauchsmaterialien

Name	Bezugsquelle
12-Well-Plates, steril	Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE)
96-Well-Plates, steril + unsteril	Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE)
Clean-Up Extraction Columns	UCT (Bristol, PA, USA)
Deckgläschen	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE)
Objektgläser	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE)
S-Monovette 5,5 ml LH (16 I.E./ml)	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE)
Zellschaber	Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE)

3.1.7 Laborgeräte

Name	Bezugsquelle
Acquity™ Ultraperformance LC System	Waters GmbH (Eschborn, DE)
AxioCam MR Camera	Carl Zeiss Jena GmbH (Jena, DE)
Eppendorf Centrifuge 5424 R	Eppendorf AG (Hamburg, DE)
Hera Guard HPH 15 (Laminar Air Flow Bench)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Heraeus Centrifuge Multifuge X3	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
HPLC System LaChrome Elite	VWR International (Darmstadt, DE)
MilliQ Direct 8	Merck Millipore (Darmstadt, DE)
Multipipette	Eppendorf AG (Hamburg, DE)
Multiscan Spectrum PlateReader	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

Plan Neofluar 3100/1.30 Oil (DIC III) objective	Carl Zeiss Jena GmbH (Jena, DE)
Präzisionswaage PT3100	Sartorius (Göttingen, DE)
QTRAP 5500 Massenspektrometer	AB Sciex (Darmstadt, DE)
Shaker DOS-10L	neoLab Migge (Heidelberg, DE)
Ultraschallstab Sonifier 250	Branson Ultrasonics (Danbury, CT, USA)
Vi-Cell™ XR Cell Viability Analyzer	Beckman Coulter (Krefeld, DE)
Visiprep™ 24, Supelco (Festphasenextraktionsgerät)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Vortex Mixer 7-2020	neoLab Migge (Heidelberg, DE)
WTC Binder Inkubator	Binder GmbH (Tuttlingen, DE)
Zeiss AxioObserver Z1	Carl Zeiss Jena GmbH (Jena, DE)
Zeiss Axiovert 200 M Microscope	Carl Zeiss Jena GmbH (Jena, DE)

3.1.8 Software und Analytik

Programm	Name	Bezugsquelle
3D-Graphiksoftware	PyMOL	Schrödinger LLC (New York, NY, USA)
Grafikprogramm	GraphPad Prism 4.00	GraphPad Software Inc. (La Jolla, CA, USA)
Software HPLC	EZChrom Elite 3.3.2	Agilent Technologie Inc. (Santa Clara, CA, USA)
Software LC-MS/MS	Analyst 1.6 Software	AB Sciex (Warrington, UK)
Software PlateReader	ScanIt 2.4.4 Software	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Software Zellzähler	ViCell XR 2.03	Beckman Coulter (Krefeld, DE)
Statistikprogramm	GraphPad Instat 3.05	GraphPad Software Inc. (La Jolla, CA, USA)
Strukturformelzeichner	ChemDoodle Web Components	iChemLabs LLC (Chesterfield, VA, USA)

Die Datenerhebung und Auswertung erfolgte mittels obengenannter Software. Die quantitative Analyse wurde über manuelle Integration der *area under the curve* (AUC) durchgeführt (HPLC über EZChrom Elite, LS-MS/MS über Analyst 1.6) und anschließend in Microsoft Excel übertragen. Dort wurden die Werte auf den internen Standard (PGB₁) bezogen und die Auswertung in Bezug auf die DMSO-Kontrolle (gesetzt 100%) vorgenommen, sodass sich die Aktivität der Proben in Prozent zur DMSO-Kontrolle darstellt. Die Werte wurden aus drei voneinander unabhängigen, jedoch unter denselben Messbedingungen erfolgten Versuchen bestimmt (n=3). Die Angaben verstehen sich als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Die graphische Darstellung der Kurven zur Ermittlung der IC₅₀-Werte wurde mittels GraphPad Prism vorgenommen, wobei sich die Werte ebenfalls auf den errechneten Mittelwert \pm Standardfehler beziehen. Zusätzlich wurden die Werte logarithmiert und mittels *sigmoidal dose-response* dargestellt. Die Diagramme wurden ebenfalls mit GraphPad Prism erstellt und zeigen wiederum den Mittelwert \pm Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte nach Logarithmieren der Werte mittels GraphPad InStat. Zur Ermittlung der Signifikanz wurden die Daten mittels einfaktorieller ANOVA (analysis of variance) und anschließend Dunnett's Post-hoc-Test analysiert. Wurde nur eine Probenkonzentration mit der Kontrolle verglichen, wurde die Signifikanz mittels eines ungepaarten t-Tests ermittelt.

3.2 Methoden

3.2.1 Aufreinigung von humanen PMNL und Monozyten aus Leukozytenkonzentraten

3.2.1.1 Isolierung humaner PMNL aus Leukozytenkonzentraten

Die Leukozytenkonzentrate (Buffy Coats) wurden in der Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Jena durch Zentrifugation aus venösem Blut gesunder SpenderInnen gewonnen. Voraussetzung zur Blutspende war, mindestens 7 Tage lang keine Medikamente eingenommen zu haben.

Die Aufreinigung erfolgte unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank. Die Konzentrate wurden in vorbereiteten Falcon-Tubes mit je 10 ml PBS-Dextran [5%] vermischt und auf 50 ml aufgefüllt. Nach 45 min war die gewünschte Sedimentation der Erythrozyten erreicht. Anschließend wurde die überstehende Zellsuspension vorsichtig abgenommen und langsam auf ein Dichtezentrifugationsmedium (Histopaque®-1077) geschichtet. Die Suspension wurde bei 2000 rpm für 10 min bei Raumtemperatur (RT) ohne Bremse zentrifugiert, um die einzelnen Fraktionen der Zelldichte nach aufzutrennen. Die *peripheral blood mononuclear cell* (PBMC)-Fraktion wurde abgenommen, in PBS-Puffer resuspendiert und entsprechend den Angaben in Kapitel 3.2.1.2 aufgereinigt. Das Pellet, welches die PMNL enthielt, wurde ebenfalls mit 5 ml eiskaltem PBS-Puffer resuspendiert. Nachfolgend wurde das Falcon auf 50 ml mit PBS-Puffer aufgefüllt und erneut zentrifugiert (1200 rpm, 4 °C, 10 min).

Zur osmotischen Lyse der Erythrozyten wurden 10 ml eiskaltes destilliertes Wasser auf das Pellet gegeben und 45 sek gevortext. Der Prozess wurde durch Zugabe von PBS-Puffer gestoppt, um die Lyse der restlichen Zellen zu vermeiden. Es folgte eine erneute Zentrifugation (1200 rpm, 4 °C, 10 min). Nach zweifachem Waschen wurde eine Zellzählung mittels Vi-CELL XR in 50-facher Verdünnung vorgenommen. Die Anfärbung der Zellen erfolgte hierbei mit Trypanblau-Lösung.

3.2.1.2 Isolierung humaner Monozyten aus PBMC

Die Isolierung humaner Monozyten aus den Leukozytenkonzentraten erfolgte bis einschließlich der Dichtezentrifugation analog zur PMNL-Isolation. Nach der Zentrifugation wurde der weißliche Ring unterhalb des Thrombozytenüberstandes, welcher die PBMC enthält, vorsichtig abpipettiert und in einem Falcon-Tube mit eiskaltem PBS-Puffer resuspendiert. Es folgte das

zweifache Waschen des Pellets mit jeweils anschließender Zentrifugation (1200 rpm, 4 °C, 10 min). Das Pellet wurde in 1 ml PBS-Puffer resuspendiert und analog zur PMNL-Isolation (mittels Vi-CELL XR in 50-facher Verdünnung) gezählt. Mit der Zählung wird nun die gesamte PMBC-Fraktion, bestehend aus B-Zellen, T-Zellen und Monozyten, erfasst. Um die Monozyten von T- und B-Zellen zu isolieren, wurden 200×10^6 PBMC in eine Zellkulturflasche mit 20 ml RPMI-Medium, supplementiert mit FCS [10%], PenStrep [1%] und L-Gln [1 mM], gegeben und für 1 ½ Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

Es folgte das vorsichtige Lösen der adhärenenten Monozyten in PBS-Puffer mittels eines Zellschabers. Die abschließende Zentrifugation führte zur Anreicherung der Monozyten im Pellet, welches in 1 ml RPMI-Medium (mit FCS [5 %]) bzw. in PBS-Glucose [0,1 %] resuspendiert wurde. Es folgte die Zellzählung analog zur PMNL- und PMBC-Isolation.

3.2.2 Isolierung von rekombinanter 5-LO aus Escherichia coli (BL21)

Zur Gewinnung isolierter 5-LO wurden mit dem Plasmid pT3-5LO transformierte Escherichia coli (E.coli) verwendet (Zhang et al. 1992). Diese wurden in LB-Medium (5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, 10 g Pepton, 1 ml Natronlauge (NaOH) [1 M], 1000 ml MilliQ-Wasser, pH 7,2) mit Ampicillin (0,1 mg/ml) bei 37 °C über Nacht kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurden die Bakterien in sterile Erlenmeyerkolben überführt, sobald die Übernachtskultur eine optische Dichte von ca. 1,7 (bei 620 nm) erreicht hatte. Die Erlenmeyerkolben enthielten hierbei LB-Medium mit Ampicillin (0,1 mg/ml), welches nun zusätzlich mit FeSO₄ [0,01 mM] und MgSO₄ [2 mM] versetzt worden war. Die Kultur wurde damit 1:100 verdünnt. Sobald die Kultur nach 4-6 Stunden (Kultivierung bei 37 °C) eine optische Dichte von 0,3 (bei 620 nm) erreicht hatte, wurde die Expression der 5-LO durch Zugabe von IPTG-Lösung [3,2 ml/l] bei 30 °C über Nacht induziert.

Am nächsten Tag sollte die Kultur eine optische Dichte von 2,0-3,0 erreicht haben. Der Kolbeninhalt wurde sodann 15 min bei 4000 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet zur späteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

Zur Aufreinigung wurde das Pellet in Lysispuffer (50 ml Homogenisierungspuffer + 25 mg Lysozym + 6 mg/ml STI + 100 mM PMSF + 2 M DTT) vorsichtig resuspendiert und 45 min auf Eis stehen gelassen. Anschließend wurde die Zellsuspension mit dem Ultraschallstab homogenisiert (3 x 20 sek) und dazwischen auf Eis gelagert, um einer Denaturierung des Enzyms durch Hitze vorzubeugen. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 20 min bei 40000 g

und 4 °C, nach welchem sich die rekombinante 5-LO im Überstand befand. Diese wurde nun mittels ATP-Agarose-Chromatographie aufgereinigt. Hierfür wurde die Säule eine Stunde vor Auftragen des Überstandes mit PBS-EDTA [1 mM] equilibriert, um störende Calciumionen durch Komplexbildung zu entfernen. Anschließend wurde der Überstand aufgegeben und mit PBS-EDTA [1 mM] gewaschen. Es folgten zwei weitere Waschschrte, der erste mit Phosphatpuffer [50 mM], EDTA und NaCl, der zweite nur mit Phosphatpuffer [50 mM] und EDTA. Die rekombinante 5-LO wurde abschließend mittels Elutionspuffer (Phosphatpuffer [50 mM], ATP [20 mM] und EDTA [1 mM]) eluiert.

Abschließend erfolgte die Bestimmung der Aktivität und die anschließende Verdünnung mittels PBS-EDTA [1 mM] auf die gewünschte Enzymkonzentration, wobei verschiedene Verdünnungen getestet wurden und diese, bei welcher die Peakfläche von 5-HETE annähernd der von PGB₁ [200 ng] entsprach, für geeignet befunden.

3.2.3 Bestimmung der 5-LO-Produktbildung am isolierten Enzym, in PMNL, in Monozyten und im Vollblut

3.2.3.1 5-LO-Produktbildung am isolierten Enzym

Um die Testsubstanzen in Bezug auf ihr inhibitorisches Potential auf die 5-LO am isolierten Enzym zu charakterisieren, wurde rekombinante 5-LO (siehe Kapitel 3.2.2) nach entsprechender Verdünnung mit PBS-EDTA [1 mM] zunächst resuspendiert und auf 1 ml aliquotiert. Kurz bevor die Testsubstanzen hinzugegeben wurden, wurde ATP [1 mM] zur Suspension pipettiert. Es folgte die Vorinkubation mit den Testsubstanzen für 10 min auf Eis. Vor der Stimulation wurden die Zentrifugenröhrchen für 30 sek im Wasserbad bei 37 °C vorgewärmt. Die Stimulation erfolgte anschließend mit CaCl₂ [2 mM] und AA [20 µM] für 10 min bei 37 °C. Abgestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von je 1 ml eiskaltem MeOH und Überführen der Reaktionsansätze auf Eis. Abschließend wurden 530 µl PBS-HCl-Puffer [1 N] und 200 ng Prostaglandin B₁ (PGB₁), als interner Standard, hinzugegeben.

Für die Festphasenextraktion der LT wurden die C18-Säulen (Umkehrphase) zunächst mit Methanol [100%] und MilliQ-Wasser konditioniert. Die Proben mit den darin enthaltenen LT wurden daraufhin auf die Extraktionssäulen aufgegeben. Anschließend wurde mit MilliQ-Wasser und Methanol [25%], gewaschen. Die verbliebenen LT wurden mit 300 µl Methanol [100%] eluiert und mit 120 µl MilliQ-Wasser versetzt. Nach Zentrifugation (15000 rpm, 4 °C,

5 min) konnten die Proben mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Fließmittel: MeOH/MilliQ-Wasser/TFA [72/28/0,007], Nadelspüllösung: MeOH/MilliQ-Wasser [50/50], Fluss: 1,2 ml/min) bei 235 nm (LTB₄, trans-LTB₄, epi-trans-LTB₄, PGB₁) und 280 nm (5-HETE, 12-HETE und 15-HETE) vermessen und quantitativ bestimmt werden. Die Peakflächen wurden mittels EZChrom Elite manuell integriert und anschließend mittels Microsoft Excel, nach Korrektur der Peakflächen über PGB₁ [200 ng] als Standard, ausgewertet.

3.2.3.2 5-LO-Produktbildung in PMNL

Um das inhibitorische Potential der Testsubstanzen auf die 5-LO in PMNL zu bestimmen, wurde die gewünschte Zellzahl ($5 \times 10^6/\text{ml}$) an zuvor frisch isolierten PMNL (siehe Kapitel 3.2.1.1) entnommen und mit PBS-Glucose-Puffer [0,1%] und CaCl₂-Lösung [1 mM] entsprechend verdünnt. Diese wurden in Zentrifugenröhrchen auf Eis zu je 1 ml aliquotiert und mit den Testsubstanzen sowie einer Positiv- (5-LO-Inhibitor Zileuton [3 µM]) und einer Negativkontrolle (DMSO [0,1%]) für 15 min im Wasserbad bei 37 °C vorinkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mit A23187 [2,5 µM] (\pm AA [20 µM]) stimuliert. Nach 10 min wurde die Reaktion durch Zugabe von MeOH [100%] und sofortiges Überführen des Reaktionsansatzes auf Eis abgestoppt. Abschließend wurden 530 µl PBS-HCl-Puffer [1 N] und 200 ng PGB₁, als interner Standard, hinzugegeben und die Proben zentrifugiert (2000 rpm, 4 °C, 10 min).

Die Festphasenextraktion wie auch die quantitative Bestimmung mittels HPLC erfolgte analog zu der des isolierten Enzyms (siehe Kapitel 3.2.3.1).

3.2.3.3 5-LO-Produktbildung in Monozyten

Für Monozyten ($2 \times 10^6/\text{ml}$) erfolgte der 5-LO-Assay bis zur Festphasenextraktion analog zu dem bei PMNL (siehe Kapitel 3.2.3.2). Die Säulen wurden entsprechend vorbereitet und die Probe nach der Zentrifugation aufgegeben. Gewaschen wurde zweifach mit MilliQ-Wasser, anstatt mit Methanol [25%]. Die LT wurden mit 300 µl Methanol [100%] eluiert, zweimal zentrifugiert (15000 rpm, 4 °C, 5 min) und nicht weiter verdünnt.

Die Analyse und quantitative Bestimmung der Proben wurde mittels Massenspektrometer und vorangehender Ultra Performance Liquid Chromatographie (UPLC) (Acquity™ Ultrapformance LC System) vorgenommen. In der UPLC wurden die Eikosanoide bei einer Flussrate von 0,8 ml/min aufgetrennt (Säulentemperatur 45 °C). Die Lösungsmittel der mobilen Phase waren A) Acetonitril (ACN)/Ameisensäure (100/0,07) und B) MilliQ-Wasser/ACN/Ameisensäure (90/10/0,07). Die Auftrennung erfolgte zunächst isokratisch (A/B

= 30%, 2 min) und anschließend mit linearem Gradienten (B = 70%, 5 min). Das UPLC-System war gekoppelt an das Massenspektrometer QTRAP 5500, in welchem die gewünschten Eikosanoide detektiert und quantifiziert wurden. Über Elektronenstoßionisation wurden die Eikosanoide ionisiert und anschließend dem Massenspektrometer zugeführt. Die Detektion erfolgte im Negativ-Modus bei einer Temperatur von 500 °C, einer Ionenspannung von 4500 V und einer Verweildauer von 10 ms. Über die Retentionszeit und die aufgezeichneten spezifischen Übergänge Q1 und Q3 konnten die einzelnen Eikosanoide identifiziert werden. Die Quantifizierung [pg] erfolgte über Integration der AUC mittels der Software Analyst 1.6, als Bezug diente dabei der interne Standard PGB₁ [200 ng].

3.2.3.4 5-LO-Produktbildung in Vollblut

Zur Bestimmung des Einflusses der Testsubstanzen auf die 5-LO-Aktivität in Vollblut wurde Heparin-Vollblut von gesunden Spendern, welche mindestens 12 Stunden nüchtern waren, verwendet.

Zu Beginn wurde das Blut in Zentrifugenröhrchen zu je 1 ml aliquotiert und mit den zu testenden Substanzen [3 und 30 µM], einer DMSO-Kontrolle [0,1%] und dem Kontrollinhibitor Zileuton [3 µM] im Wasserbad bei 37 °C für 20 min vorinkubiert. Es folgte die Stimulation der Zellen mit A23187 [30 µM], bevor die Reaktion nach 10 min auf Eis mit Methanol [100%] abgestoppt wurde. Vor dem Abnehmen des Überstands wurde zentrifugiert (10 min, 4 °C, 600 g). 500 µl des Überstandes wurden mit 2000 µl Methanol und 200 ng PGB₁ über Nacht bei -20 °C präzipitieren gelassen. Am nächsten Tag wurden die Proben erneut zentrifugiert (15 min, 4 °C, 600 g) und der Überstand mit der dreifachen Menge an PBS-Puffer und HCl [1 N] versetzt.

Die Festphasenextraktion erfolgte analog zu der bei Monozyten. Die LT wurden nach der Eluierung mit 300 µl Methanol [100%] mit 100 µl MilliQ-Wasser verdünnt und zweimal zentrifugiert (10000 rpm, 4 °C, 5 min). Die Analyse und quantitative Bestimmung erfolgte ebenfalls wie bei den Monozyten mittels Ultra Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS).

3.2.4 Isolierung von Mikrosomen aus A549-Zellen nach Induktion der mPGES-1

A549-Zellen ($2 \times 10^6/\text{ml}$), welche ursprünglich aus einem Bronchialkarzinom gewonnen worden waren (Giard et al. 1973), wurden in DMEM-Medium mit FCS [10%] und PenStrep (Penicillin [100 U/ml], Streptomycin [0,1 mg/ml]) bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Das Medium wurde nach 24 h durch DMEM-Medium mit FCS [2%] und PenStrep ersetzt. Anschließend wurde die Translation der mPGES-1 durch Zugabe von Interleukin-1 β (IL-1 β) [1 ng/ml] stimuliert.

Nach 5 Tagen wurden die Zellen durch Zugabe von Trypsin/EDTA abgelöst. Die Zellen wurden zentrifugiert (1200 g, 10 min), mit PBS-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde für 1 min in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurde 1 ml auf 4 °C gekühlten Homogenisierungspuffer (0,1 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,4, 250 mM Saccharose, 1 mM PMSF, 60 $\mu\text{g/ml}$ STI, 1 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin und 2,5 mM GSH) hinzugegeben, das Pellet darin aufgetaut und resuspendiert. Diese Suspension wurde auf Eis drei Mal 20 sek mit einem Ultraschallstab homogenisiert und im Anschluss zentrifugiert (10000 g, 10 min, 4 °C). Der Überstand mit den darin enthaltenen Mikrosomen wurde abgenommen und zentrifugiert (174000 g, 4 °C, 1 Stunde). Das Pellet wurde in 1 ml Homogenisierungspuffer resuspendiert, abhängig von der Proteinkonzentration (15463 $\mu\text{g/ml}$). Nach einer Verdünnungsreihe wurde diejenige Proteinkonzentration gewählt, welche bei der Quantifizierung über die HPLC in etwa die gleiche Peakfläche wie der interne Standard (β -PGE₂) aufwies (37,5 $\mu\text{g/ml}$). Das resuspendierte Pellet wurde aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.2.5 Bestimmung der mPGES-1-Produktbildung in Mikrosomen

Die aus A549-Zellen aufgereinigten Mikrosomen (siehe Kapitel 3.2.4) wurden entsprechend ihrer Proteinkonzentration (37,5 $\mu\text{g/ml}$) mit Homogenisierungspuffer verdünnt und zu je 50 μl auf einer 96-Well-Platte vorgelegt. Die Mikrosomensuspension wurde mit den Testsubstanzen [3 und 30 $\mu\text{g/ml}$] bzw. DMSO [0,1%] oder dem Kontrollinhibitor MK886 [10 μM] für 15 min bei 4 °C vorinkubiert. Nach 10 min wurde eine der beiden DMSO-Kontrollen ohne weitere Stimulierung mit der Stopp-Lösung (FeCl₂ [40 mM], Citronensäure [80 mM], 11 β -PGE₂ [10 mg/ml] als interner Standard und MilliQ-Wasser) versehen, wodurch die Enzymreaktion zum Erliegen kam. Diese Probe fungierte somit als Blank-Kontrolle. Nach weiteren 5 min wurde die

Reaktion der restlichen Proben durch Zugabe von 50 µl PGH₂-Puffer [60,4 nM] als Substrat der mPGES-1 gestartet und nach 1 min mit 100 µl der Stopp-Lösung abgestoppt.

Zur Festphasenextraktion wurden die C18-Säulen (Umkehrphase) zunächst mit Acetonitril (ACN) [100%] und MilliQ-Wasser konditioniert, anschließend die Proben auf die Säule aufgegeben und zweimal mit MilliQ-Wasser gewaschen. Die PG wurden nachfolgend mit 200 µl ACN [100%] eluiert. Das Eluat wurde mit 400 µl MilliQ-Wasser verdünnt und die PG mittels HPLC (Fließmittel ACN/MilliQ-Wasser/TFA [30/70/0,007] quantitativ bei 195 nm (PGE₂ und interner Standard 11β-PGE₂ [10 mg/ml]) bestimmt.

3.2.6 Bestimmung der Zytotoxizität in Monozyten (MTT Assay)

Das Prinzip des MTT-Assays beruht auf der durch mitochondriale Dehydrogenasen vermittelten Umwandlung des 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromids (MTT) in Formazan (wasserunlöslich), welches sich in einem Farbumschlag von schwach gelb nach dunkelblau photometrisch auswerten lässt. Nur lebende Zellen sind in der Lage, diese Reaktion zu katalysieren, weshalb die Ergebnisse des Assays stark mit der Viabilität der Zellen korrelieren (Mosmann 1983).

Frisch isolierte Monozyten (2×10^6 /ml) (siehe Kapitel 3.2.1.2) wurden in RPMI-Medium + FCS [5%] auf $0,2 \times 10^6$ /ml verdünnt und auf eine 96-Well-Platte gegeben. Die Monozyten wurden mit Triplets der zu testenden Substanzen [3 und 30 µM] bzw. DMSO [0,5%], Staurosporin [1 µM] oder Ethanol [16,7%] 24 Stunden lang im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Suspensionen mit je 20 µl MTT (5 mg/ml in sterilem PBS-Puffer) 2-4 Stunden bei 37 °C inkubiert, bis eine deutliche Blaufärbung und Kristallbildung in der Ethanolkontrolle unter dem Lichtmikroskop zu erkennen war. Nachfolgend wurden die Kristalle mit je 100 µl SDS-Lyse-Puffer (SDS [10%] in HCl [20 mM]; pH 4,5) aufgelöst und die Platten bei 175 rpm 16-20 Stunden im Dunkeln geschwenkt, um das entstandene Formazan für die Analytik zugänglich zu machen. Die photometrische Messung der Absorption erfolgte am darauffolgenden Tag mittels eines Multiscan Spectrometer Plate Readers bei einer Wellenlänge von 570 nm.

3.2.7 Bestimmung der COX-1/COX-2-Produktbildung an isolierter COX-1/COX-2

In ein Falcon-Tube mit Tris-Puffer wurden GSH [5 mM], Hämoglobin [5 µM] und EDTA [1 mM] gegeben und dieses mit MilliQ-Wasser aufgefüllt. Isolierte COX-1 [50 U/ml] bzw. COX-2 [20 U/ml], aliquotiert und bei -80 °C gelagert, wurden zum Inkubationspuffer pipettiert. Die Vorinkubation mit den Testsubstanzen [1, 3 und 10 µM] bzw. der Kontrollinhibitoren Indometacin [10 µM] (oder Celecoxib [1 µM] für COX-2) sowie DMSO [0,1%] erfolgte für 5 min bei RT. Anschließend wurden die Inkubationsansätze für 60 sek im Wasserbad bei 37 °C vorgewärmt und durch die Zugabe von AA (COX-1 [5 µM], COX-2 [2 µM]) bei 37 °C stimuliert. Nach fünfminütiger Inkubation wurde die Reaktion mit Methanol [100%] abgestoppt und die Probe sofort auf Eis gestellt. Es wurden 200 ng PGB₁ als Standard sowie 530 µl PBS-HCl-Puffer [1 N] hinzugegeben.

Die Festphasenextraktion erfolgte analog zum 5-LO-Assay bei PMNL (siehe Kapitel 3.2.3). Zur quantitativen Bestimmung der Produktbildung von 12-HHT wurden die Proben mittels HPLC bei 230 nm vermessen.

3.2.8 Proximity-Ligation-Assay in Monozyten

Frisch aufgereinigte PBMC (siehe Kapitel 3.2.1.2) wurden mit RPMI-Medium, welches mit FCS [10%], PenStrep [1%] und L-Gln [1 mM] supplementiert war, in der gewünschten Dichte (10×10^6 /ml) in 1 ml in einer 12-Well-Platte auf Deckgläschen angesetzt. Diese wurden 1 ½ Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert, um die Monozyten auf den Deckgläschen adhären zu lassen.

Es folgten zwei Waschschrte mit PBS-Puffer, welche die nicht adhärenen T- und B-Zellen entfernten. Anschließend wurde in CaCl₂-PBS-Puffer [1 mM] mit den Testsubstanzen (CTA1, CTA2, SZK1 oder SZK5 [3 µM]) bzw. MK886 [1 µM] als Kontrollinhibitor oder DMSO [0,1%] 10 min bei 37 °C vorinkubiert und mit A23187 [2,5 µM] für 20 min bei 37 °C stimuliert. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen mit PFA [4%] für 20 min bei RT auf den Deckgläschen fixiert.

Danach wurden die Zellen mit PBS-Puffer dreimal für 5 min bei 200 rpm gewaschen. Um die Monozyten zu permeabilisieren, wurden die Zellen zunächst für 3 min bei 4 °C mit Aceton [100%] versetzt, anschließend bei RT für 10 min mit Triton X-100 [0,25%]. Um unspezifische

Bindungsstellen für die Antikörper zu blockieren, wurden die Zellen für 30 min mit der *Duolink Blocking Solution* bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Monozyten mit dem Primärantikörper (mouse anti-5-LO [1:100] und rabbit anti-FLAP [1:150]) in *Duolink Antibody Diluent* über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen gewaschen und eine Verdünnung der PLA-Sonden, anti-mouse MINUS und anti-rabbit PLUS, jeweils 1:5, in *Duolink Antibody Diluent* vorbereitet. Darin wurden die Zellen eine Stunde lang bei 37 °C inkubiert. In dieser Zeit konnten die Sonden an den Primärantikörper binden. Anschließend wurde zweimal für 5 min bei 200 rpm gewaschen.

Die Inkubation mit dem Ligations-Mix erfolgte bei 37 °C für 30 min. Die darin enthaltene Ligase verbindet bei vorliegender Protein-Protein-Interaktion bzw. unter der Voraussetzung, dass die Sonden nicht mehr als 40 nm voneinander entfernt liegen, die jeweiligen Oligonukleotide der Sonden (Soderberg et al. 2006). Es folgte ein zweiminütiges Waschen der Zellen für 2 min bei 200 rpm. Danach erfolgte die Vervielfältigung der zuvor ligierten Strukturen mit dem Amplifikations-Mix (100 min, 37 °C im Dunkeln) nach dem Prinzip der „rolling circle amplification“ (Clausson et al. 2015). Zeitgleich hybridisierten die ebenfalls im Mix enthaltenen fluoreszierenden Oligonukleotide, welche später unter dem Fluoreszenzmikroskop als rote Signale sichtbar werden, an die amplifizierte DNA (Soderberg et al. 2007) (**Abb. 16**). Im Anschluss daran wurden die Zellen erneut gewaschen.

Zum Schluss folgte die Übertragung und Fixation der Deckgläschen auf mit Mowiol und DAPI benetzte Objektträger. Die Auswertung zeigt bei vorliegender Protein-Protein-Interaktion rot fluoreszierende Signale im Zeiss-Axiovert-200M-Fluoreszenzmikroskop bei 555 nm Wellenlänge und einer 40-fachen Vergrößerung (Gerstmeier et al. 2016a).

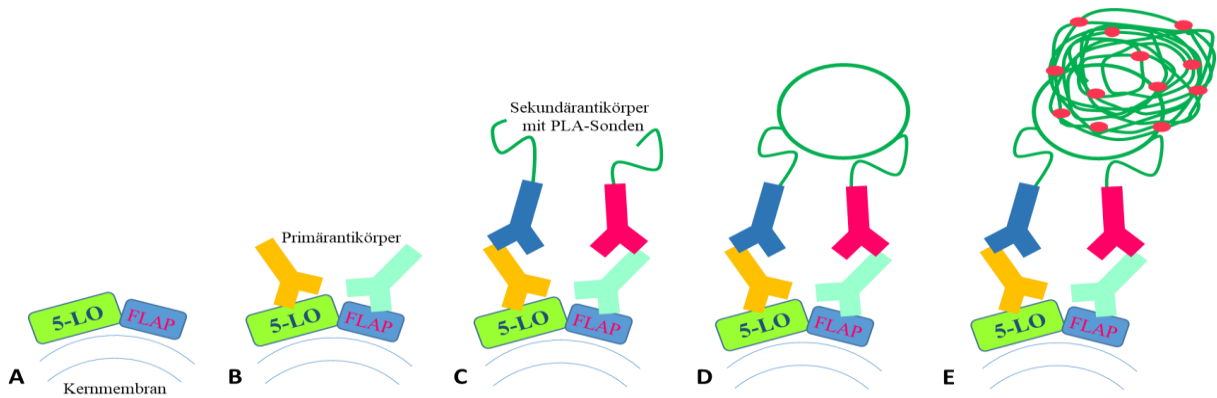


Abb. 16: Prinzip des Proximity-Ligation-Assays.

Nach Stimulation der Monozyten mit A23187 [$2,5 \mu\text{M}$] für 20 min kommt es zur Kolokalisation der 5-LO und des FLAP an der Kernmembran (A). Über Nacht binden bei 4°C die Primärantikörper mouse anti-5-LO und rabbit anti-FLAP an die jeweilige Zielstruktur (B). Am darauffolgenden Tag werden die Zellen mit den mit Oligonukleotiden verknüpften Sekundärantikörpern anti-mouse MINUS und anti-rabbit PLUS inkubiert, welche an die jeweiligen Primärantikörper binden (C). Anschließend folgt die Verknüpfung der Oligonukleotide mittels einer Ligase unter der Voraussetzung, dass die Strukturen $< 40 \text{ nm}$ voneinander entfernt sind (D). Zur Visualisierung werden die DNA-Sequenzen nach dem Prinzip der „rolling-circle-amplification“ vervielfältigt. An diese binden die Gensonden, welche als magenta fluoreszierende Signale unter dem Mikroskop sichtbar werden (E).

4. ERGEBNISSE

4.1 Inhibitorisches Potential der Pflanzenextrakte aus Sri Lanka auf die Eikosanoidbiosynthese

Die Extrakte aus *Garcinia cambogia* (GC), *Pothos scandens* (POT), *Nyctanthes arbor-tristis* (SF) und *Plectranthus zeylanicus* (PL) wurden aus den Pflanzenteilen mit verschiedenen Extraktionsmitteln unterschiedlicher Polarität (Hexan, DCM, EtOAc, MeOH) gewonnen (siehe Kapitel 1.4, **Tab. 1**). Das Extraktionsmittel wurde verdampft, die Extrakte getrocknet und anschließend in DMSO (0,1%) gelöst. Um den Einfluss der Pflanzenextrakte sowohl auf die LT- als auch die PG-Biosynthese evaluieren zu können, wurden diese auf ihr inhibitorisches Potential im Hinblick auf die 5-LO und die mPGES-1 getestet. Zunächst wurden die Extrakte in den Konzentrationen 3 und 30 µg/ml in PMNL bezüglich ihrer Wirkung auf die 5-LO-Aktivität und in Mikrosomen aus A549-Zellen im Hinblick auf die mPGES-1-Inhibierung untersucht. Ergab sich eine Hemmung unter 50% bei 3 µg/ml, wurde der IC₅₀-Wert der Extrakte ermittelt und diese zusätzlich hinsichtlich einer Hemmung isolierter 5-LO analysiert.

4.1.1 Inhibierung der Leukotrien-Biosynthese

Für die Bestimmung der 5-LO-Aktivität wurden aus Leukozytenkonzentraten aufgereinigte PMNL (5x10⁶/ml) gewählt. Nach 15-minütiger Vorinkubation mit den Testsubstanzen (Extrakte aus GC, POT, SF oder PL) bei 37 °C wurden die Zellen mit A23187 [2,5 µM] + AA [20 µM] für 10 min zur LT-Biosynthese stimuliert.

In den Balkendiagrammen der **Abb. 17** ist die inhibitorische Wirkung der getesteten Substanzen auf die 5-LO-Aktivität [%] in den Konzentrationen 3 µg/ml (weiß) und 30 µg/ml (schwarz) dargestellt. **Abb. 17 A** zeigt den Einfluss der Extrakte aus GC, **Abb. 17 B** den der Extrakte aus POT, **Abb. 17 C** den der Extrakte aus SF und **Abb. 17 D** den der Extrakte aus PL. Dabei führten die GC- und PL-Extrakte bei 30 µg/ml, extrahiert mit allen Extraktionsmitteln, zu einer deutlich verminderten Synthese der 5-LO-Produkte (trans-LTB₄, epitrans-LTB₄, LTB₄ und 5-HETE), verglichen mit der DMSO-Kontrolle (100%). Als Positivkontrolle und Referenzinhibitor der 5-LO diene Zileuton [3 µM], durch welches die 5-LO-Aktivität um ~40% gehemmt wurde. Bei 3 µg/ml konnten die Extrakte GC 1-3 (extrahiert mit den lipophilen Lösungsmitteln Hexan, DCM und EtOAc) die 5-LO-Aktivität um > 95% hemmen, der PL-8-Extrakt um > 60% und

PL-20 um ca. 87%. Aufgrund ihrer potenten 5-LO-Hemmung wurde von den genannten Extrakten der IC_{50} -Wert bestimmt. Im Gegensatz dazu konnten der Extrakt aus GC mit MeOH als hydrophiles Extraktionsmittel (GC-4) sowie die Extrakte aus POT und SF die Aktivität der 5-LO bei 3 $\mu\text{g/ml}$ nicht signifikant inhibieren.

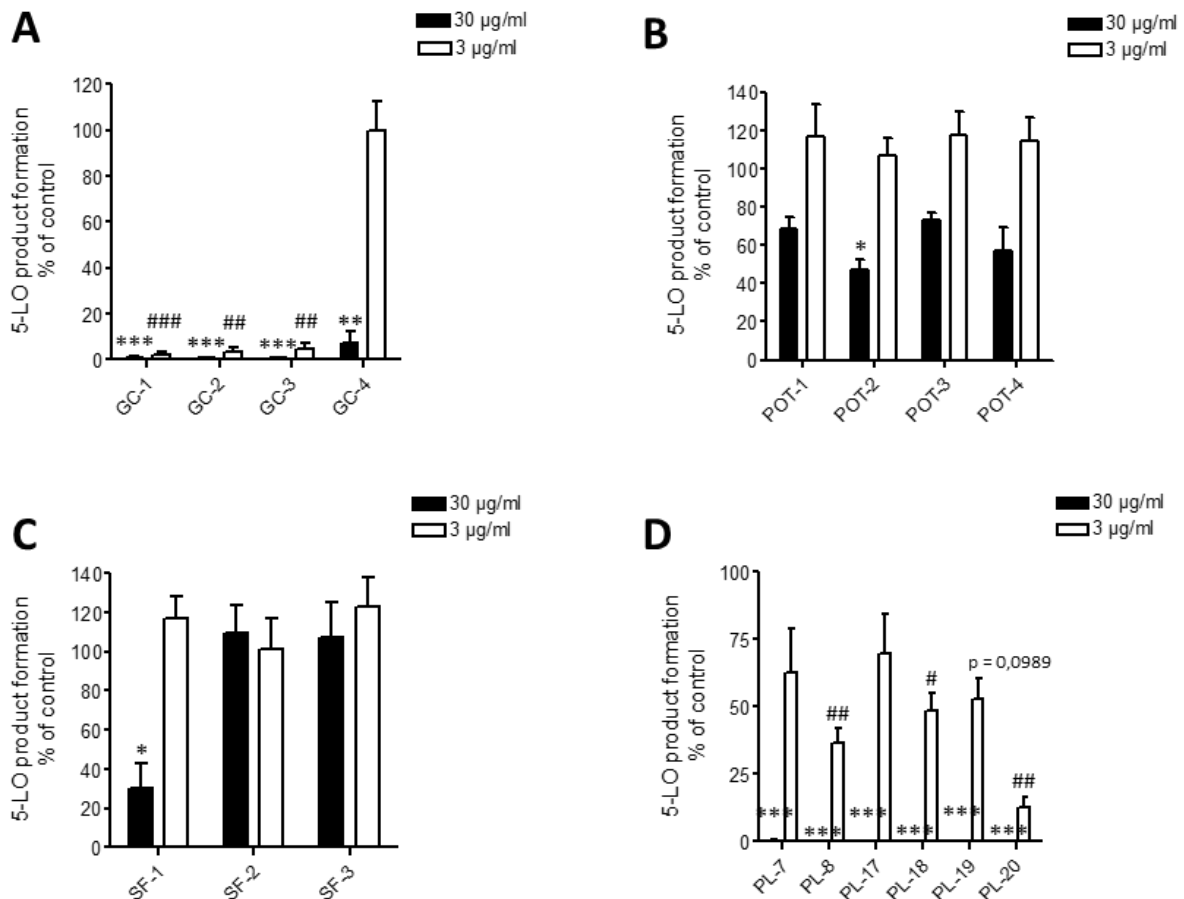


Abb. 17: Hemmung der LT-Biosynthese durch die Pflanzenextrakte aus Sri Lanka in PMNL.

PMNL ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden 15 min mit den Testsubstanzen [3 oder 30 $\mu\text{g/ml}$] bei 37 °C vorinkubiert und anschließend für 10 min mit A23187 [2,5 μM] und AA [20 μM] stimuliert. Die Bestimmung der 5-LO-Produktbildung erfolgte nach Festphasenextraktion über RP-C18-Extraktionssäulen mittels HPLC. Kontrollinhibitor: Zileuton [3 μM]. $n=3$. Die Werte sind in Prozent zu Vehikel (0,1% DMSO) als Mittelwert + SEM angegeben. Für die statistische Analyse wurden die Werte logarithmiert und ein ungepaarter t-Test durchgeführt. $p < 0,001$ (***/###), $p < 0,01$ (**/##), $p < 0,05$ (*/#).

Die Bestimmung der IC_{50} -Werte der Extrakte GC 1-3 sowie PL-8 und PL-20 erfolgte sowohl in PMNL als auch am isolierten Enzym, der rekombinanten 5-LO. Nach der 10-minütigen Vorinkubation der Testsubstanzen mit rekombinanter 5-LO erfolgte die Stimulation mit CaCl_2 [2 mM] + AA [20 μM] für weitere 10 min bei 37 °C. **Abb. 18** zeigt den Einfluss der Extrakte auf die 5-LO-Aktivität rekombinanter 5-LO [%] in steigender Konzentration. Anhand des

sigmoidalen Kurvenverlaufs wurde für GC-1 (Extraktionsmittel Hexan) ein IC_{50} -Wert von 0,15 $\mu\text{g/ml}$ ermittelt, für GC-2 (Extraktionsmittel DCM) von 0,16 $\mu\text{g/ml}$ und für GC-3 (Extraktionsmittel EtOAc) von 0,24 $\mu\text{g/ml}$ (Abb. 18 A). Bei PL-8 lag der IC_{50} -Wert bei 1,3 $\mu\text{g/ml}$, für PL-20 bei 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (Abb. 18 B). Als synthetischer Kontrollinhibitor der 5-LO diente BWA4C [0,1 μM], mit einer Inhibition um ~50%.

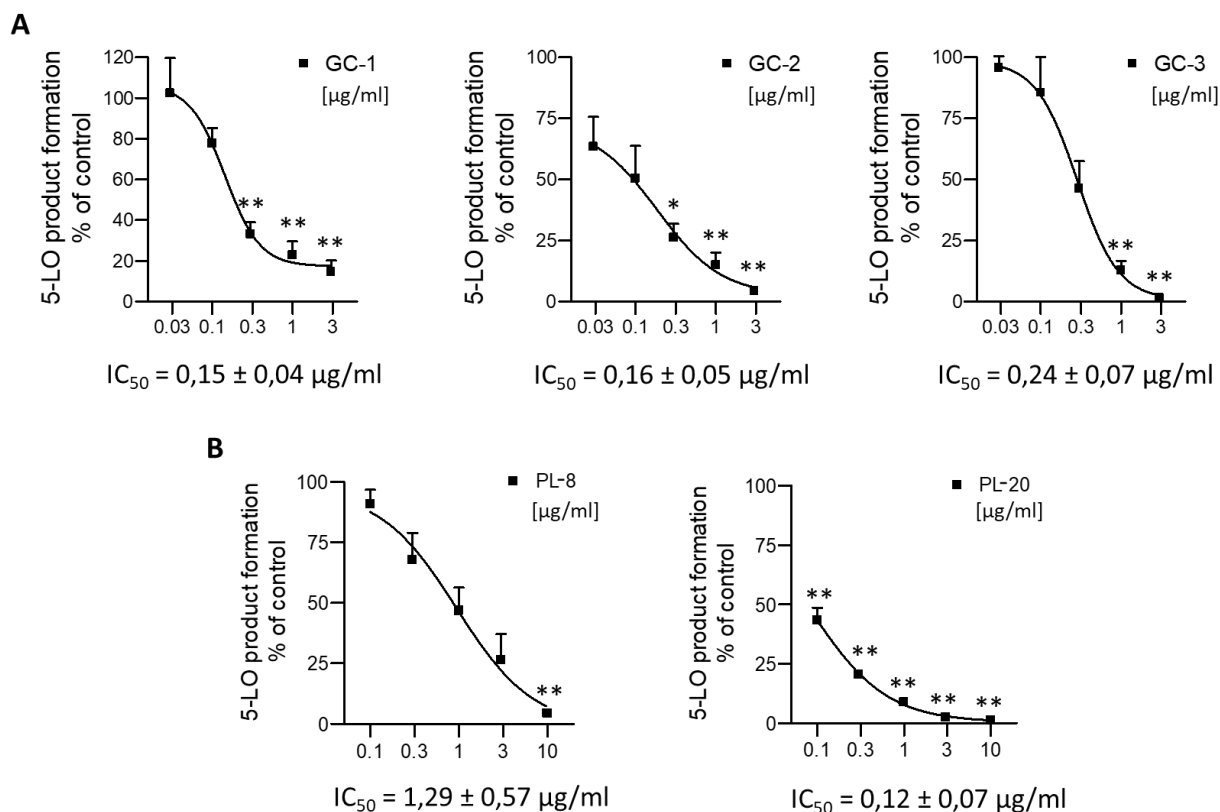


Abb. 18: Hemmung der LT-Biosynthese durch *Garcinia cambogia* (A) und *Plectranthus zeylanicus* (B) in rekombinanter 5-LO (Berechnung der IC_{50} -Werte).

Die Testsubstanzen wurden mit rekombinanter 5-LO 10 min auf Eis vorinkubiert. Die Stimulation erfolgte mit CaCl_2 [2 mM] + AA [20 μM] für 10 min bei 37 °C. Die Bestimmung der 5-LO-Produktbildung erfolgte nach Festphasenextraktion über RP-C18-Extraktionssäulen mittels HPLC. Kontrollinhibitor: BWA4C [0,1 μM]. $n=3$. Die Werte sind in Prozent zu Vehikel (0,1% DMSO) als Mittelwert + SEM angegeben. Für die statistische Analyse wurden die Werte logarithmiert und eine einfaktorielle ANOVA mit Dunnett's Post-hoc-Test durchgeführt. $p < 0,01$ (**), $p < 0,05$ (*).

Weiterhin wurde der IC_{50} -Wert in PMNL bestimmt. Diese ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden nach 15-minütiger Vorinkubation bei 37 °C mit den Testsubstanzen für 10 min mit A23187 [2,5 μM] + AA [20 μM] zur LT-Biosynthese stimuliert. Abb. 19 zeigt das inhibitorische Potential der getesteten Extrakte hinsichtlich der 5-LO-Aktivität [%] in steigender Konzentration. Für GC (Abb. 19 A) nach Extraktion mittels Hexan (GC-1) ergab sich ein IC_{50} -Wert von 0,92 $\mu\text{g/ml}$, mittels DCM (GC-2) lag der IC_{50} -Wert bei 1,39 $\mu\text{g/ml}$ und mittels EtOAc (GC-3) bei 1,55

$\mu\text{g/ml}$. Für PL (Abb. 19 B) wurden die Werte $\text{IC}_{50} = 5,31$ (PL-8) und $\text{IC}_{50} = 1,70 \mu\text{g/ml}$ (PL-20) ermittelt. Als synthetischer Kontrollinhibitor der 5-LO diente erneut BWA4C [$0,1 \mu\text{M}$], der die 5-LO-Aktivität in PMNL um 50,2% senkte.

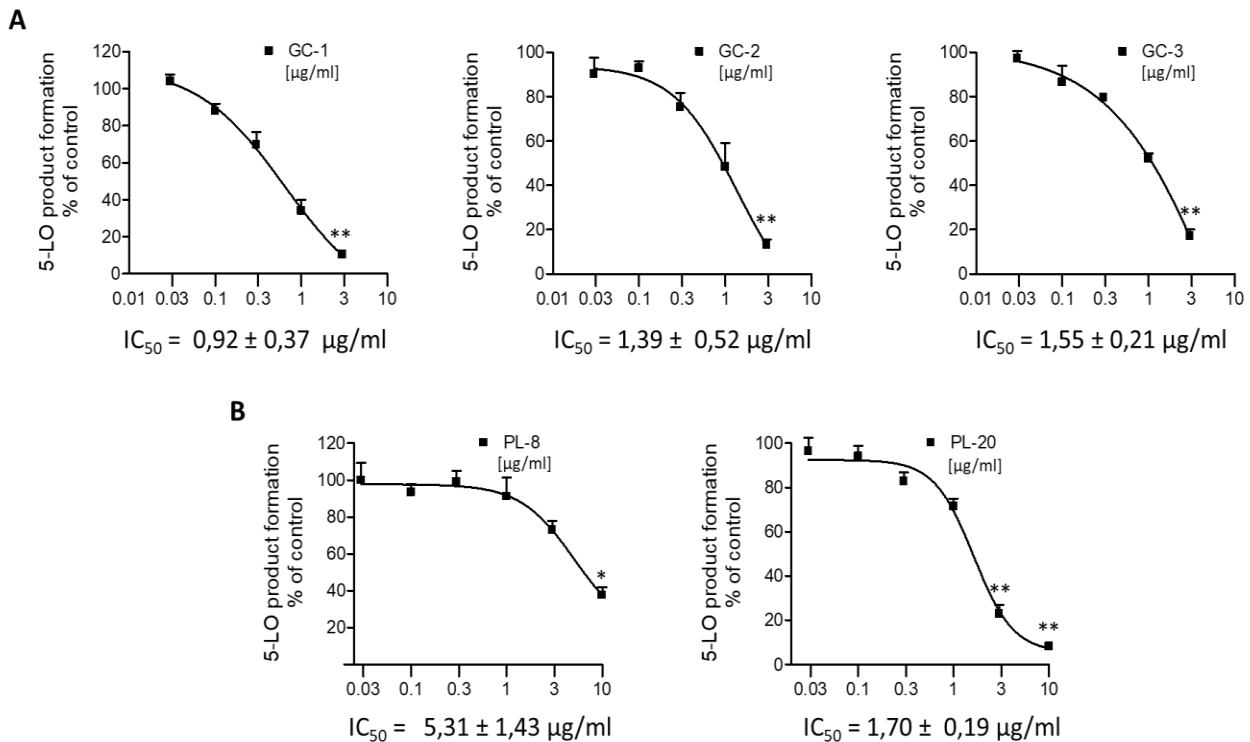


Abb. 19: Hemmung der LT-Biosynthese durch *Garcinia cambogia* (A) und *Plectranthus zeylanicus* (B) in PMNL (Berechnung der IC_{50} -Werte).

PMNL ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden 15 min mit den Testsubstanzen [3 oder $30 \mu\text{g/ml}$] bei 37°C vorinkubiert und anschließend für 10 min mit A23187 [$2,5 \mu\text{M}$] und AA [$20 \mu\text{M}$] stimuliert. Die Bestimmung der 5-LO-Produktbildung erfolgte nach Festphasenextraktion über RP-C18-Extraktionssäulen mittels HPLC. Kontrollinhibitor: BWA4C [$0,1 \mu\text{M}$]. $n=3$. Die Werte sind in Prozent zu Vehikel ($0,1\%$ DMSO) als Mittelwert + SEM angegeben. Für die statistische Analyse wurden die Werte logarithmiert und eine einfaktorielle ANOVA mit Dunnett's Post-hoc-Test durchgeführt. $p < 0,01$ (**), $p < 0,05$ (*).

4.1.2 Hemmung der mPGES-1-Aktivität

Zur Evaluation der mPGES-1-Hemmung durch die Pflanzenextrakte aus Sri Lanka wurden A549-Mikrosomen als Testsystem gewählt. Diese wurden mit den Extrakten 15 min bei 4°C vorinkubiert, bevor die Reaktion anschließend durch Zugabe des Substrates PGH_2 [$60,4 \text{ nM}$] gestartet und nach 1 min abgestoppt wurde.

Die Balkendiagramme in Abb. 20 zeigen zunächst den hemmenden Einfluss aller getesteten Pflanzenextrakte auf die Aktivität der mPGES-1 [%] in den Konzentrationen $3 \mu\text{g/ml}$ (weiß)

und 30 µg/ml (schwarz). Dabei wiesen die lipophilen Extrakte aus GC (GC 1-3) (**Abb. 20 A**) und POT 1-4 (**Abb. 20 B**) sowohl bei 3 als auch bei 30 µg/ml eine potente Hemmung der Enzymaktivität um > 75% auf, verglichen mit der DMSO-Kontrolle (gesetzt 100%). Die meisten Extrakte aus PL (**Abb. 20 D**) hemmten die mPGES-1-Aktivität bei 30 µg/ml ebenfalls um > 75%, jedoch konnten sie bei 3 µg/ml nur noch eine Inhibition um 25-50% erreichen. Die Extrakte aus SF (**Abb. 20 C**) sowie der mit MeOH extrahierte Extrakt aus GC (GC-4) konnten die mPGES-1-Aktivität, ähnlich zu den Ergebnissen der Untersuchungen an der isolierten 5-LO, nicht signifikant hemmen. Lediglich 30 µg/ml SF-1 inhibierte die mPGES-1-Aktivität um ~60%. Als Positivkontrolle diente der mPGES-1-Inhibitor MK886 [10 µM], der die mPGES-1-Aktivität um ~86% senkte.

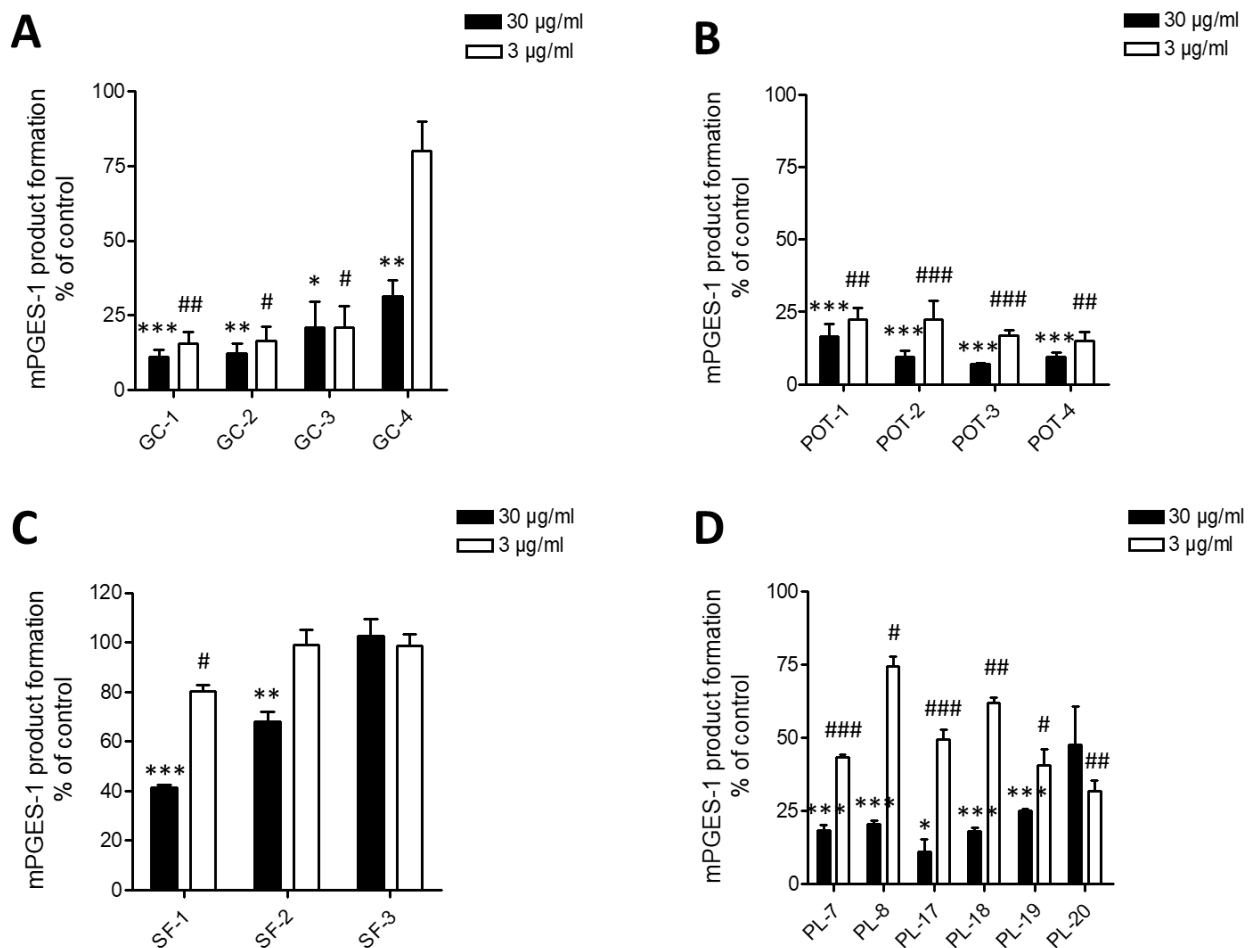


Abb. 20: Hemmung mPGES-1-Aktivität durch die Pflanzenextrakte aus Sri Lanka.

A549-Mikrosomen wurden mit den Testsubstanzen [3 oder 30 µg/ml] für 15 min bei 4 °C vorinkubiert und anschließend 1 min mit dem Substrat PGH₂ [60,4 nM] inkubiert. Die Bestimmung der Produktbildung erfolgte nach Festphasenextraktion über RP-C18-Extraktionssäulen mittels HPLC. Kontrollinhibitor: MK886 [10 µM]. n=3. Die Werte sind in Prozent zu Vehikel (0,1% DMSO) als Mittelwert + SEM angegeben. Für die statistische Analyse wurden die Werte logarithmiert und ein ungepaarter t-Test durchgeführt. $p < 0,001$ (***/###), $p < 0,01$ (**/##), $p < 0,05$ (*/#).

Für die Extrakte GC 1-3 und POT 1-4 wurden aufgrund der potenten Hemmung der Enzymaktivität um > 75% bei 3 µg/ml die jeweiligen IC_{50} -Werte bestimmt. **Abb. 21** zeigt den Einfluss dieser Extrakte auf die prozentuale Enzymaktivität der mPGES-1 in steigender Konzentration, was in einem sigmoidalen Kurvenverlauf resultierte. Die lipophilen Extrakte 1-3 (Hexan, DCM, EtOAc) aus GC (**Abb. 21 A**) führten zu einer potenten Hemmung mit IC_{50} -Werten < 1 µg/ml (GC-1 IC_{50} = 0,29 µg/ml, GC-2 IC_{50} = 0,49 µg/ml, GC-3 IC_{50} = 0,85 µg/ml) und für die aus POT (**Abb. 21 B**) sogar < 0,5 µg/ml (POT-1 IC_{50} = 0,5 µg/ml, POT-2 IC_{50} = 0,27 µg/ml, POT-3 IC_{50} = 0,1 µg/ml, POT-4 IC_{50} = 0,2 µg/ml). Als synthetischer Kontrollinhibitor diente erneut MK886 [10 µM].

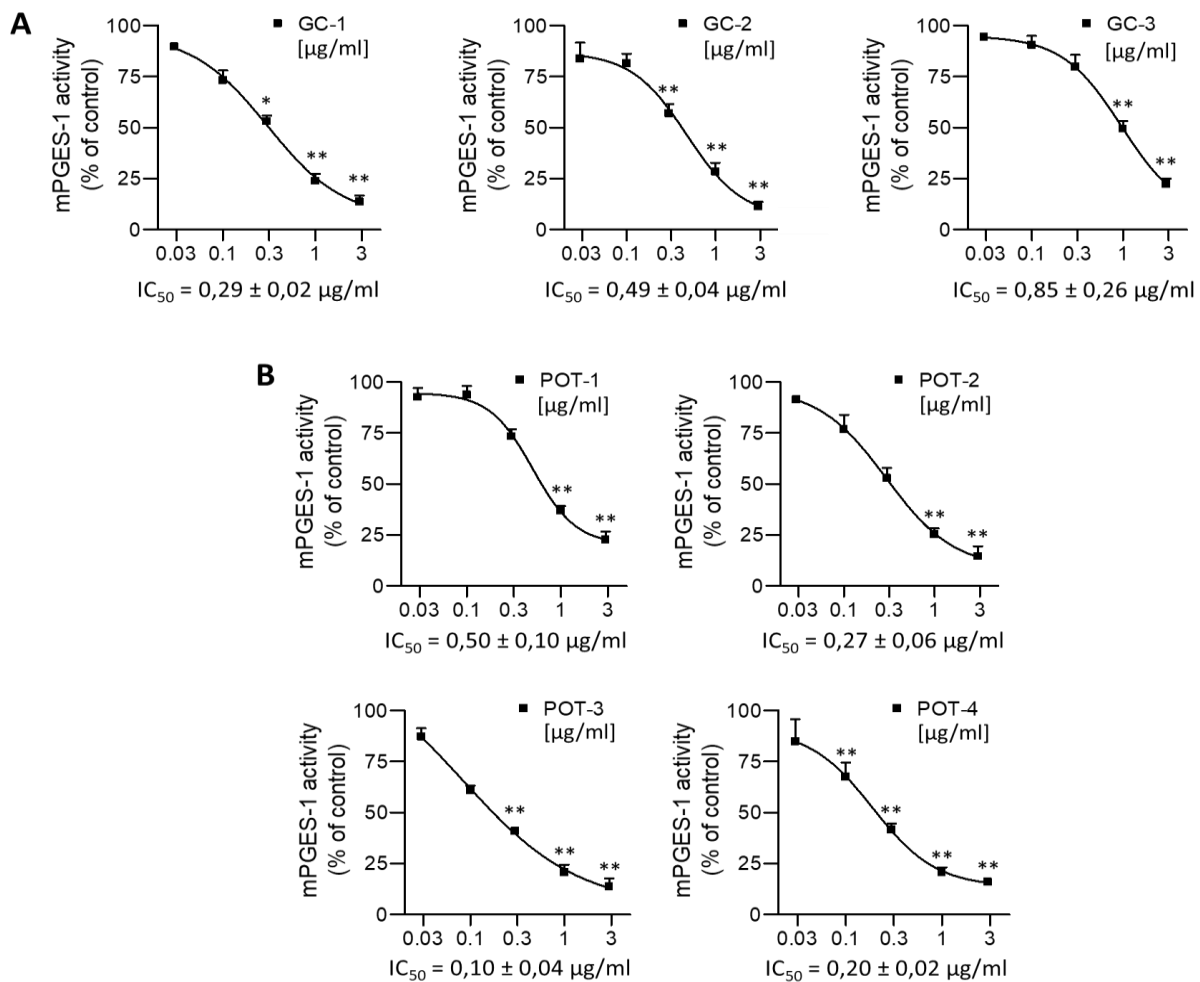


Abb. 21: Hemmung der mPGES-1-Aktivität durch *Garcinia cambogia* (A) und *Pothos scandens* (B) (Berechnung der IC_{50} -Werte).

A549-Mikrosomen wurden mit den Testsubstanzen für 15 min bei 4 °C vorinkubiert und anschließend 1 min mit dem Substrat PGH₂ [60,4 nM] inkubiert. Die Bestimmung der Produktbildung erfolgte nach Festphasenextraktion über RP-C18-Extraktionssäulen mittels HPLC. Kontrollinhibitor: MK886 [10 µM]. n=3. Die Werte sind in Prozent zu Vehikel (0,1% DMSO) als Mittelwert + SEM angegeben. Für die statistische Analyse wurden die Werte logarithmiert und eine einfaktorielle ANOVA mit Dunnett's Post-hoc-Test durchgeführt. $p < 0,01$ (**), $p < 0,05$ (*).

Tab. 3 zeigt zusammenfassend das inhibitorische Potential der näher untersuchten Pflanzenextrakte anhand der ermittelten IC_{50} -Werte sowohl bezüglich der Hemmung der 5-LO als auch der mPGES-1. Der Pflanzenextrakt aus *Nyctanthes arbor-tristis* wurde aufgrund seiner unzureichenden Hemmung der Enzymaktivität sowohl der 5-LO als auch der mPGES-1 nicht weiter auf eine mögliche Inhibition dieser Enzyme getestet.

Tab. 3: IC_{50} -Werte der Pflanzenextrakte aus *Garcinia cambogia*, *Pothos scandens* und *Plectranthus zeylanicus* bezüglich der Hemmwirkung auf die 5-LO- und die mPGES-1-Aktivität.

Pflanzenextrakt	Extraktionsmittel	IC_{50} 5-LO i.E. [$\mu\text{g/ml}$]	IC_{50} 5-LO PMNL [$\mu\text{g/ml}$]	IC_{50} mPGES-1 [$\mu\text{g/ml}$]
GC-1	Hexan	$0,15 \pm 0,04$	$0,92 \pm 0,37$	$0,29 \pm 0,02$
GC-2	DCM	$0,16 \pm 0,05$	$1,39 \pm 0,52$	$0,49 \pm 0,04$
GC-3	EtOAc	$0,24 \pm 0,07$	$1,55 \pm 0,21$	$0,85 \pm 0,26$
POT-1	Hexan	-	-	$0,50 \pm 0,10$
POT-2	DCM	-	-	$0,27 \pm 0,06$
POT-3	EtOAc	-	-	$0,10 \pm 0,04$
POT-4	MeOH	-	-	$0,20 \pm 0,02$
PL-8	DCM	$1,29 \pm 0,57$	$5,31 \pm 1,43$	-
PL-20	DCM	$0,12 \pm 0,07$	$1,70 \pm 0,19$	-

4.2 Untersuchung dualer mPGES-1/LTC₄-Synthase-Inhibitoren

Die anhand von Docking-Studien designten Substanzen CTA1, CTA2, SZK1 und SZK5 wurden im Labor der Università degli Studi di Salerno, Fisciano, Italien synthetisiert (Di Micco et al. 2018). Aufgrund der Zugehörigkeit der mPGES-1 zur MAPEG-Superfamilie und strukturellen Ähnlichkeit zur LTC₄S wurden die Substanzen von Vincenza Cantone nicht nur hinsichtlich ihrer Hemmwirkung auf die mPGES-1 sondern auch auf die LTC₄S (Stefanie Liening) untersucht, was erfolgversprechende IC₅₀-Werte lieferte (siehe Kapitel 1.5, **Tab. 2**). Die Resultate gaben Anlass zur ausführlichen Charakterisierung und Untersuchung der Selektivität dieser Substanzen auf weitere Enzyme des AA-Stoffwechsels sowie zur Überprüfung der Zytotoxizität im Hinblick auf spätere *in vivo*-Untersuchungen.

4.2.1 Einfluss der dualen mPGES-1/LTC₄S-Inhibitoren auf die metabolische Aktivität in humanen Monozyten

Zur Bestimmung der metabolischen Aktivität und somit des zytotoxischen Einflusses der Testsubstanzen auf humane Monozyten ($0,2 \times 10^6/\text{ml}$) wurden diese für 24 Stunden bei 37 °C mit CTA1, CTA2, SZK1 oder SZK5 in den Konzentrationen 3 und 30 µg/ml inkubiert. Nach zweistündiger Inkubation mit MTT wurden die Zellen mit SDS-Lysepuffer lysiert und die Proben photometrisch bei 570 nm ausgewertet.

Abb. 22 zeigt in Balkendiagrammen den Einfluss der getesteten Substanzen, dargestellt in Schwarz, auf die Zellviabilität. Verglichen mit der DMSO-Kontrolle, dargestellt in Weiß, welche als 100% gesetzt wurde, zeigten sowohl CTA1 und CTA2 (**Abb. 22 A**) als auch SZK1 und SZK5 (**Abb. 22 B**) bei einer Konzentration von 3 µM keinen Einfluss auf die metabolische Aktivität der Zellen. Bei 30 µM wurde die Viabilität durch die vier Testsubstanzen um ~40% vermindert, CTA2 senkte die metabolische Aktivität der Zellen um ~60%. Als Kontrollinhibitor diente Staurosporin [1 µM], ebenfalls in Schwarz dargestellt, welcher zu einer 60%igen Hemmung führte.

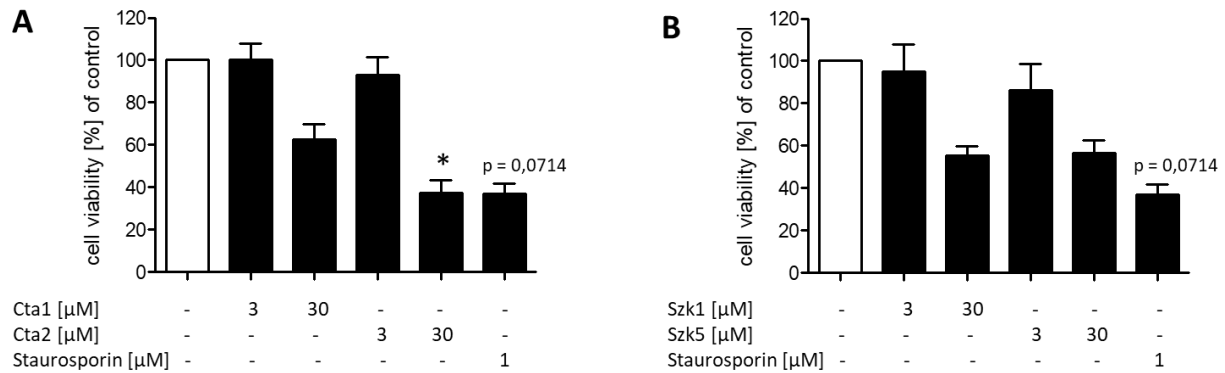


Abb. 22: Einfluss der Testsubstanzen CTA1 und CTA2 (A) sowie SZK1 und SZK5 (B) auf die Zytotoxizität in Monozyten.

Monozyten ($0,2 \times 10^6/\text{ml}$) wurden 24 h bei 37 °C mit den Testsubstanzen [3 oder 30 µM] in RPMI-Medium mit FCS [5%] inkubiert. Es folgte die zweistündige Inkubation mit MTT [5 mg/ml] und eine anschließende Zelllyse mit SDS. Die photometrische Auswertung erfolgte bei 570 nm. Kontrollinhibitor: Staurosporin [1 µM]. $n=4$. Die Werte sind in Prozent zu Vehikel (0,1% DMSO) als Mittelwert + SEM angegeben. Für die statistische Analyse wurden die Werte logarithmiert und ein ungepaarter t-Test durchgeführt. $p < 0,05$ (*).

4.2.2 Hemmung der Leukotrien-Biosynthese durch duale mPGES-1/LTC₄S-Inhibitoren

4.2.2.1 Direkte Hemmung der 5-LO

Die Untersuchung der 5-LO-Hemmung durch die Testsubstanzen anhand rekombinanter 5-LO diente der Kategorisierung der Substanzen in direkte und indirekte 5-LO-Inhibitoren. Nach Isolation des Enzyms aus *E.coli*-Bakterien wurde die 5-LO mit ATP [1 mM] versetzt und 10 min mit den Testsubstanzen CTA1 und CTA2 vorinkubiert. Es folgte die Stimulation mit CaCl₂ [2 mM] + AA [20 µM] für 10 min bei 37 °C.

Abb. 23 zeigt den hemmenden Einfluss von CTA1 und CTA2 auf die Aktivität der 5-LO [%] bei steigender Konzentration. Bei 1 µM war sowohl unter dem Einfluss von CTA1 als auch unter dem von CTA2 keine Produktbildung durch die 5-LO mehr detektierbar. CTA2 hemmte diese sogar noch bei 0,1 µM komplett. Der sigmoidale Kurvenverlauf spiegelt die errechneten IC₅₀-Werte wider: CTA1: IC₅₀ = 0,17 µM, CTA2: IC₅₀ = 0,04 µM. Die DMSO-Kontrolle wurde als 100% gesetzt. Als Kontrollinhibitor diente BWA4C [0,1 µM], der die Produktbildung der 5-LO um 52,1% senkte. Diesen Wert konnte CTA1 nicht ganz erreichen, CTA2 übertraf ihn jedoch mit einer 100%-Hemmung der 5-LO-Aktivität bei 0,1 µM deutlich.

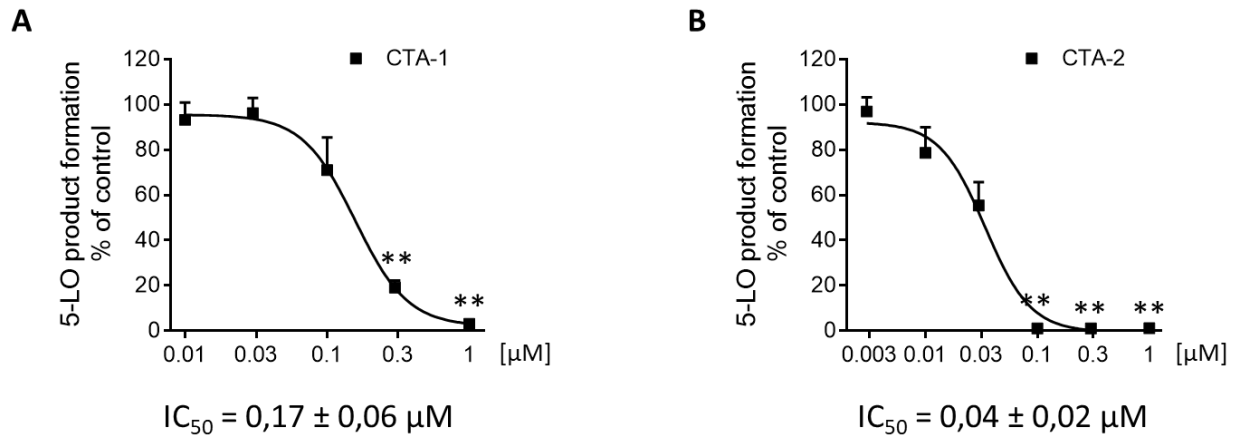


Abb. 23: Hemmung der LT-Biosynthese durch CTA1 (A) und CTA2 (B) am isolierten Enzym (Berechnung der IC_{50} -Werte).

Isolierte 5-LO wurde aus mit dem Plasmid pT3-5LO transformierten *E.coli*-Bakterien gewonnen. Nach Aufreinigung durch ATP-Agarose-Affinitätschromatographie wurde die Aktivität bestimmt und das Enzym entsprechend der Konzentration von PGB_1 und 5-HETE verdünnt. Bevor die 5-LO mit den Testsubstanzen 10 min auf Eis vorinkubiert wurde, wurde ATP [1 mM] zur Suspension pipettiert. Die Stimulation erfolgte mit $CaCl_2$ [2 mM] und AA [20 µM] für 10 min bei 37 °C. Die Bestimmung der 5-LO-Produktbildung erfolgte nach Festphasenextraktion über RP-C18-Extraktionssäulen mittels HPLC. Kontrollinhibitor: BWA4C [0,1 µM]. $n=3$. Die Werte sind in Prozent zu Vehikel (0,1% DMSO) als Mittelwert + SEM angegeben. Für die statistische Analyse wurden die Werte logarithmiert und anschließend eine einfaktorielle ANOVA mit Dunnett's Post-hoc-Test durchgeführt. $p < 0,01$ (**).

4.2.2.2 Inhibition der 5-LO-Aktivität in PMNL durch duale mPGES-1/LTC₄S-Inhibitoren

Von CTA1 und CTA2 wurde aufgrund ihrer vielversprechenden Wirkung der IC_{50} -Wert in humanen PMNL (5×10^6 /ml) ermittelt. Die Zellen wurden zunächst nur mit A23187 [2,5 µM] (Abb. 24 links), später mit A23187 [2,5 µM] + AA [20 µM] (Abb. 24 rechts) für 10 min stimuliert.

Abb. 24 stellt den hemmenden Einfluss von CTA1 (Abb. 24 A) und CTA2 (Abb. 24 B) auf die 5-LO-Aktivität in steigenden Konzentrationen von 0,1 bis 30 µM in einer sigmoidalen Kurve dar. Als Referenz diente die DMSO-Kontrolle (gesetzt 100%). Bei 10 und 30 µM hemmten die Substanzen in beiden Stimulationsversuchen die Produktbildung der 5-LO um 100%. Für CTA1 wurde ein IC_{50} -Wert von 1,72 µM (Stimulation mit A23187) bzw. von 0,98 µM (Stimulation mit A23187 + AA) ermittelt. CTA2 zeigte einen IC_{50} -Wert von 0,7 µM (Stimulation mit A23187) bzw. von 0,21 µM (Stimulation mit A23187 + AA). Als Referenzinhibitor diente der etablierte 5-LO-Inhibitor Zileuton, der bei 3 µM die Aktivität des Enzyms um 65,19% (Stimulation mit A23187) bzw. um 44,2% (Stimulation mit A23187 + AA)

senkte. Damit zeigten CTA1 und CTA2 eine potentere Inhibition der 5-LO-Produktbildung als Zileuton. Von Vincenza Cantone waren bereits zuvor IC_{50} -Werte für die Substanzen SZK1 ($IC_{50} = 3,93 \mu M$) und SZK5 ($IC_{50} = 1,40 \mu M$) nach Stimulation mit A23187 ermittelt worden.

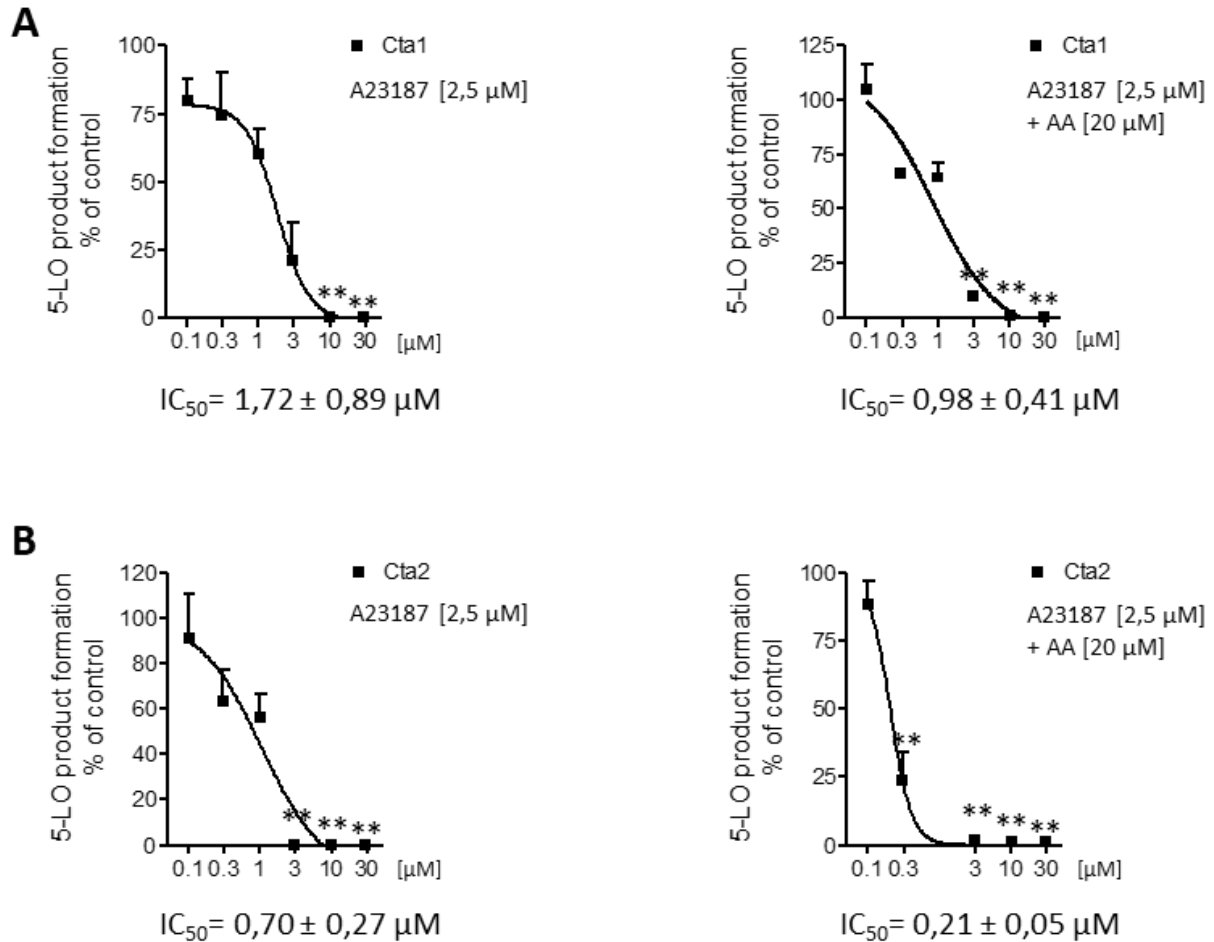


Abb. 24: Hemmung der LT-Biosynthese durch CTA1 (A) und CTA2 (B) in PMNL (Berechnung der IC_{50} -Werte).

PMNL ($5 \times 10^6/ml$) wurden 15 min mit den Testsubstanzen CTA1 oder CTA2 bei 37 °C vorinkubiert und für 10 min mit A23187 [2,5 μM] (\pm AA [20 μM]) stimuliert. Die Bestimmung der 5-LO-Produktbildung erfolgte nach Festphasenextraktion über RP-C18-Extraktionssäulen mittels HPLC. Kontrollinhibitor: Zileuton [3 μM]. $n=3$. Die Werte sind in Prozent zu Vehikel (0,1% DMSO) als Mittelwert + SEM angegeben. Für die statistische Analyse wurden die Werte logarithmiert und eine einfaktorielle ANOVA mit Dunnett's Post-hoc-Test durchgeführt. $p < 0,01$ (**).

4.2.3 Einfluss der dualen mPGES-1/LTC₄S-Inhibitoren auf die Biosynthese der 12- und 15-HETE in humanen PMNL

Die dualen mPGES-1/LTC₄S-Inhibitoren wurden nach dem Nachweis der potenten 5-LO-Hemmung an rekombinanter 5-LO und humanen PMNL auch hinsichtlich ihres Einflusses auf die 12- und 15-LO und deren entzündungsauflösende Produkte 12- und 15-HETE untersucht. Dazu wurden humane PMNL ($5 \times 10^6/\text{ml}$) nach Vorinkubation mit den Testsubstanzen CTA1 und CTA2 10 min mit A23187 [$2,5 \mu\text{M}$] + AA [$20 \mu\text{M}$] stimuliert. Die Quantifizierung der 12- und 15-HETE-Bildung wurde nach Festphasenextraktion mittels HPLC vorgenommen.

Die Balkendiagramme in **Abb. 25** zeigen in steigender Konzentration der Testsubstanzen die Bildung von 12-HETE (Schwarz) und 15-HETE (Weiß) in Prozent zur DMSO-Kontrolle (gesetzt 100%). Sowohl unter dem Einfluss von CTA1 (**Abb. 25 A**) als auch von CTA2 (**Abb. 25 B**) wurde eine deutliche Steigerung der 15-LO-Aktivität festgestellt: Durch CTA1 wurde die 15-HETE-Synthese bei einer Konzentration von $3 \mu\text{M}$ um fast 150% erhöht, durch CTA2 sogar um $> 300\%$. Die 12-HETE-Synthese blieb durch CTA2 unbeeinflusst, durch CTA1 wurde die Aktivität der 12-LO um maximal $\sim 70\%$ vermindert ($10 \mu\text{M}$), niedrige Konzentrationen ($0,1\text{--}1 \mu\text{M}$) von CTA1 blieben ohne Wirkung auf die Biosynthese der 12-HETE. Als Kontrollinhibitor wurde Zileuton [$3 \mu\text{M}$] verwendet. Dieser erhöhte die Synthese der 15-HETE um $\sim 100\%$, die Biosynthese der 12-HETE wurde durch Zileuton um $\sim 25\%$ vermindert.

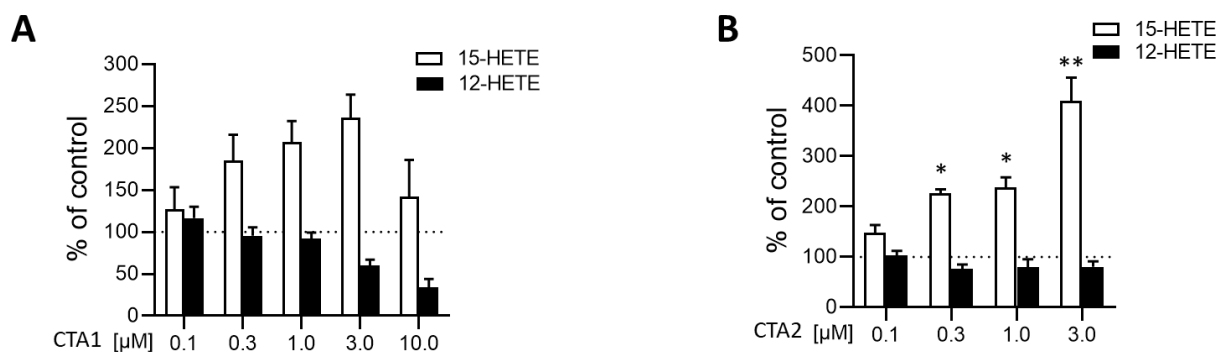


Abb. 25: Einfluss der dualen mPGES-1/LTC₄S-Inhibitoren auf die Biosynthese der 12- und 15-HETE.

PMNL ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden 15 min mit den Testsubstanzen CTA1 (A) und CTA2 (B) bei 37°C vorinkubiert und für 10 min mit A23187 [$2,5 \mu\text{M}$] + AA [$20 \mu\text{M}$] stimuliert. Die Bestimmung der 5-LO-Produktbildung erfolgte nach Festphasenextraktion über RP-C18-Extraktionssäulen mittels HPLC. Kontrollinhibitor: Zileuton [$3 \mu\text{M}$]. $n=3$. Die Werte sind in Prozent zu Vehikel (0,1% DMSO) als Mittelwert + SEM angegeben. Für die statistische Analyse wurden die Werte logarithmiert und eine einfaktorielle ANOVA mit Dunnett's Post-hoc-Test durchgeführt. $p < 0,01$ (**), $p < 0,05$ (*).

4.2.4 Lipidmediatorprofil der dualen mPGES-1/LTC₄S-Inhibitoren

Zur Evaluierung des Einflusses der dualen mPGES-1/LTC₄S-Inhibitoren auf die 5-LO und weitere Enzyme des AA-Stoffwechsels wurde in humanen Monozyten ($2 \times 10^6/\text{ml}$) und im Vollblut ein Lipidmediatorprofil mittels LC-MS/MS erstellt.

4.2.4.1 Einfluss der dualen mPGES-1/LTC₄S-Inhibitoren auf das Lipidmediatorprofil in Monozyten

Für die Bestimmung des Einflusses der Testsubstanzen auf die LT-Biosynthese und weiterer Produkte des AA-Stoffwechsels wurden humane Monozyten ($2 \times 10^6/\text{ml}$) 15 min bei 37 °C mit den Testsubstanzen vorinkubiert und anschließend mit A23187 [$2,5 \mu\text{M}$] ± AA [$20 \mu\text{M}$] über 10 min stimuliert.

Abb. 26 zeigt das LM-Profil in humanen Monozyten unter dem Einfluss von CTA1 und CTA2 nach Stimulation mit A23187 (**Abb. 26 A**) und mit A23187 + AA (**Abb. 26 B**), **Abb. 27** das der Substanzen SZK1 und SZK5 ebenfalls nach Stimulation mit A23187 (**Abb. 27 A**) bzw. mit A23187 + AA (**Abb. 27 B**). Die Heatmaps, jeweils auf der linken Seite dargestellt, stellen prozentual zur DMSO-Kontrolle (auf 100% gesetzt (weiß)) die verminderte (blau) bzw. verstärkte (rot) LM-Synthese in farblicher Abstufung dar. Die Testsubstanzen wurden in den Konzentrationen $0,1 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$ und $10 \mu\text{M}$ getestet. Als Kontrollinhibitor diente MK886 [$3 \mu\text{M}$], der als FLAP- und mPGES1-Inhibitor die Produktionsrate der 5-LO und COX verringerte. Auffallend ist in **Abb. 26** die verstärkte PG-Synthese bei gleichzeitig verminderter LT-Produktion mit steigender Konzentration von CTA1 und CTA2. Dieser Effekt ist bei den Substanzen SZK1 und SZK5 in **Abb. 27** nur nach Zugabe exogener AA (**Abb. 27 B**) erkennbar.

Aus den unterschiedlichen Stoffwechselwegen wurden charakteristische Metabolite zur Bestimmung der jeweiligen Enzymaktivität auf der rechten Seite der Abbildungen in Balkendiagrammen dargestellt. 15-HETE wurde als 15-LO-Metabolit gewählt, 5-HETE für die Evaluation der 5-LO-Hemmung, LTB₄ für die der 5-LO und der LTA₄-Hydrolase und LTC₄ für die der LTC₄S-Aktivität. Zur Evaluation der PG-Kaskade wurde PGE₂ quantifiziert. Die DMSO-Kontrolle (weiß) wurde als 100% gesetzt. Die getesteten Substanzen sind in steigender Konzentration schwarz dargestellt, der Kontrollinhibitor MK886 [$3 \mu\text{M}$] grau.

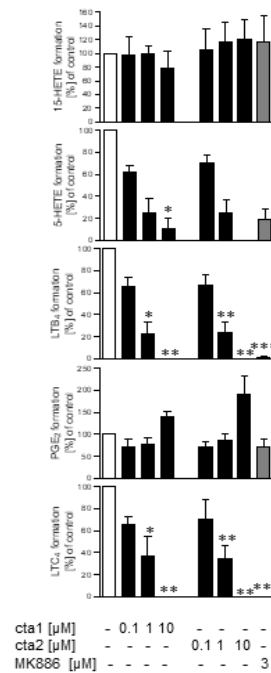
Auf die Synthese von 15-HETE konnte, wie auch unter dem Einfluss des Inhibitors MK886, bei keiner der Substanzen, weder nach Stimulation mit A23187 noch nach Zugabe exogener AA, ein Einfluss detektiert werden. Ähnlich verhielt es sich mit der Bildung von PGE₂. Lediglich SZK1 und SZK5 konnten nach Stimulation mit A23187 bei einer Konzentration von

10 μ M eine signifikante Inhibition bewirken (**Abb. 27 A**). Die anderen Substanzen führten hingegen vor allem bei hohen Konzentrationen sogar zu einer verstärkten PG-Synthese.

Auf die Synthese der 5-LO-Produkte hatten alle getesteten Substanzen in beiden Versuchsreihen einen starken inhibitorischen Einfluss. Die 5-HETE-Synthese konnte durch CTA1 und CTA2 in den Konzentrationen 1 und 10 μ M signifikant gehemmt werden. Bei 10 μ M inhibierte CTA1 die 5-HETE-Synthese um $> 80\%$, CTA2 nach Stimulation mit A23187 sogar um $\sim 100\%$ (**Abb. 26 A**). Auf SZK1 und SZK5 traf dies nach Stimulation mit A23187 ebenfalls zu (**Abb. 27 A**). Jedoch hemmten die Substanzen nach Zugabe von exogener AA die 5-HETE-Bildung deutlich geringer (**Abb. 27 B**). Ähnliche Ergebnisse konnten für die LTB₄- und LTC₄-Biosynthese gezeigt werden. Bei 10 μ M hemmten alle Testsubstanzen unter Stimulation mit A23187 die LT-Synthese um $\sim 100\%$. SZK5 zeigte auch bei 1 μ M noch eine signifikante Reduktion sowohl der LTB₄- als auch der LTC₄-Synthese auf ca. 10% Restaktivität (**Abb. 27 A**). Durch die Zugabe von exogener AA wurde die Inhibition der Biosynthese der LM, welche über den 5-LO Weg produziert werden, vermindert, während die Biosynthese von 15-HETE und PGE₂ durch die Blockade des 5-LO-Weges auf über 100% stieg. Bei einer Konzentration von 0,1 μ M konnte keine der Substanzen, weder nach Stimulation mit A23187 allein noch nach zusätzlicher exogener Zugabe von AA, eine Hemmung der LM-Synthese um $> 30\%$ bewirken.

A A23187 [2,5 μ M]

SPM precursor	100%					
8-HETE	134	91	63	88	87	66
9-HETE	59	27	12	67	33	0
11-HETE	91	102	52	97	102	63
12-HETE	90	97	53	94	96	66
15-HETE	98	89	78	105	117	121
5-HEPE	54	19	0	68	19	0
12-HEPE	86	93	57	94	92	63
14-HDHA	101	111	42	110	97	71
17-HDHA	94	103	47	103	100	72
5,12-di-HETE	66	23	0	68	24	0
5-LOX						
5-HETE	62	28	10	71	25	0
et-LTB ₄	65	23	0	67	23	0
LTB ₄	65	23	0	67	23	0
COX						
PGE ₂	72	79	141	71	87	191
PGD ₂	78	105	128	76	91	205
PGF _{2α}	67	99	129	69	70	254
TxB ₁	83	99	48	81	81	37
TxB ₂	89	96	41	87	86	31
LTC ₄ Synthase						
LTC ₄	66	37	0	71	35	0
cta1 [μ M]	0.1	1	10	-	-	-
cta2 [μ M]	-	-	-	0.1	1	10
MK886 [μ M]	-	-	-	-	-	3

**B** A23187 [2,5 μ M] + AA [20 μ M]

SPM precursor	100%					
8-HETE	158	127	100	120	107	89
9-HETE	174	76	27	100	42	22
11-HETE	152	157	164	116	123	96
12-HETE	139	131	89	106	87	40
15-HETE	163	152	130	123	127	90
5-HEPE	107	31	0	70	22	3
12-HEPE	73	65	47	58	46	115
14-HDHA	76	81	35	59	41	128
17-HDHA	90	74	46	51	37	132
5,12-di-HETE	88	39	7	73	21	5
5-LOX						
5-HETE	161	72	20	95	36	18
et-LTB ₄	88	39	7	73	21	5
LTB ₄	87	39	7	73	21	5
COX						
PGE ₂	98	114	286	103	192	149
PGD ₂	101	128	257	112	199	159
PGF _{2α}	160	122	459	103	195	344
TxB ₁	99	128	85	114	96	26
TxB ₂	115	124	93	121	96	21
LTC ₄ Synthase						
LTC ₄	105	80	0	91	29	0
cta1 [μ M]	0.1	1	10	-	-	-
cta2 [μ M]	-	-	-	0.1	1	10
MK886 [μ M]	-	-	-	-	-	3

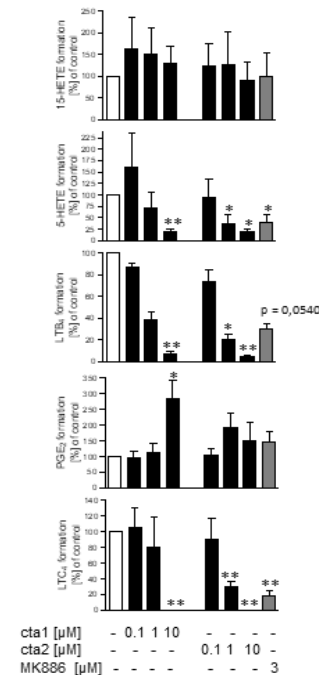


Abb. 26: Einfluss der Substanzen CTA1 und CTA2 auf die Produktbildung verschiedener Enzyme des Arachidonsäurestoffwechsels in Monozyten.

Monozyten ($2 \times 10^6/\text{ml}$) wurden 15 min mit den Testsubstanzen CTA1 oder CTA2 bei 37 °C vorinkubiert und für 10 min mit A23187 [2,5 μ M] (A) \pm AA [20 μ M] (B) stimuliert. Die Quantifizierung der LM erfolgte nach Festphasenextraktion über RP-C18-Extraktionssäulen mittels LC-MS/MS. Kontrollinhibitor: MK886 [3 μ M]. $n=3$. Die Werte sind in Prozent zu Vehikel (0,1% DMSO) als Mittelwert + SEM angegeben. Für die statistische Analyse wurden die Werte logarithmiert und eine einfaktorielle ANOVA mit Dunnett's Post-hoc-Test durchgeführt. $p < 0,001$ (***), $p < 0,01$ (**), $p < 0,05$ (*).

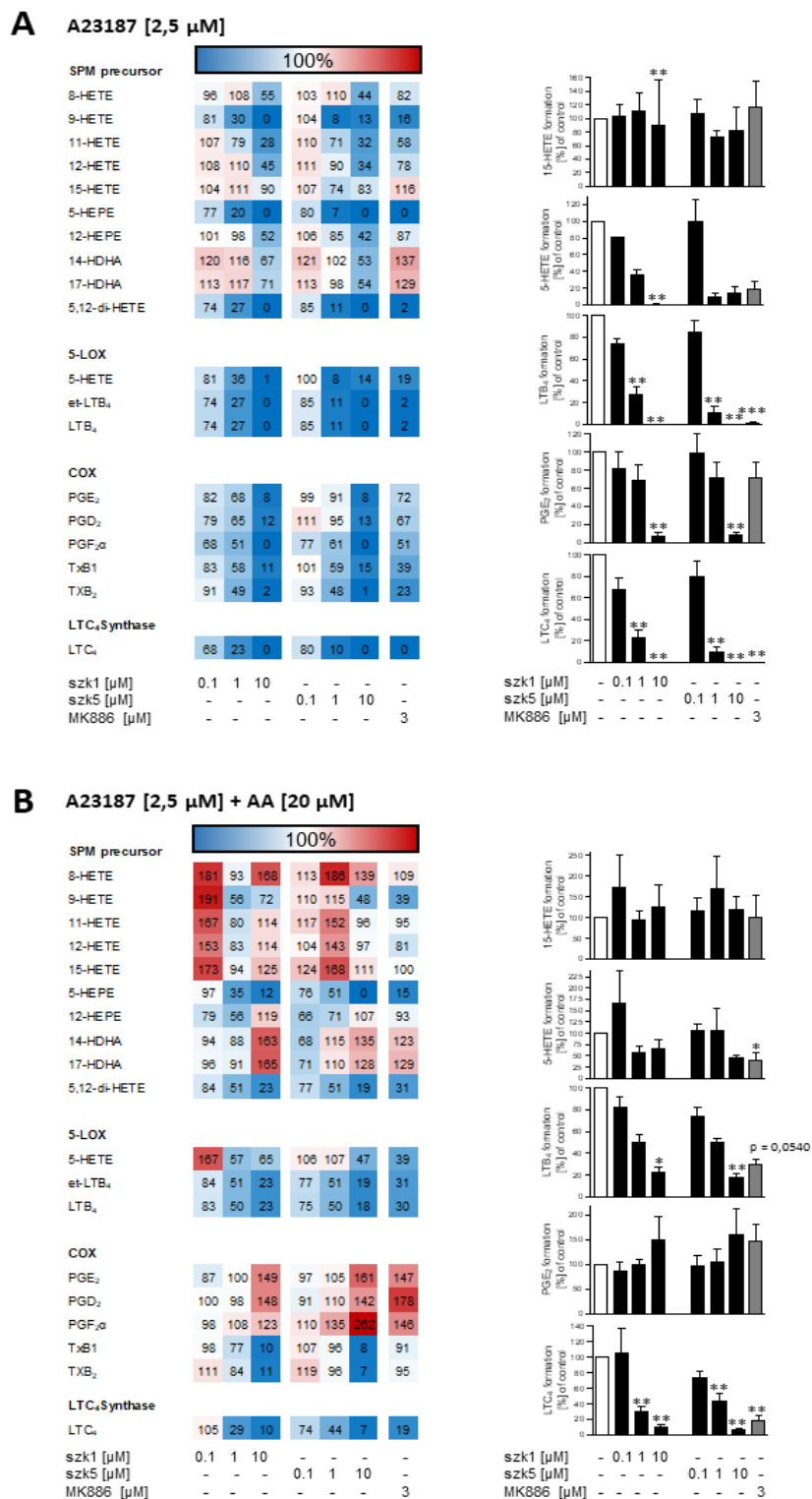


Abb. 27: Einfluss der Substanzen SZK1 und SZK5 auf die Produktbildung verschiedener Enzyme des Arachidonsäurestoffwechsels in Monozyten.

Monozyten ($2 \times 10^6/\text{ml}$) wurden 15 min mit den Testsubstanzen SZK1 oder SZK5 bei 37 °C vorinkubiert und für 10 min mit A23187 [2,5 μ M] (A) \pm AA [20 μ M] (B) stimuliert. Die Quantifizierung der LM erfolgte nach Festphasenextraktion über RP-C18-Extraktionssäulen mittels LC-MS/MS. Kontrollinhibitor: MK886 [3 μ M]. $n=3$. Die Werte sind in Prozent zu Vehikel (0,1% DMSO) als Mittelwert + SEM angegeben. Für die statistische Analyse wurden die Werte logarithmiert und eine einfaktorielle ANOVA mit Dunnett's Post-hoc-Test durchgeführt. $p < 0,001$ (***), $p < 0,01$ (**), $p < 0,05$ (*).

4.2.4.2 Einfluss der dual wirksamen mPGES-1/LTC₄S-Inhibitoren auf das Lipidmediatorprofil in humanem Vollblut

Für die Untersuchung wurde humanes Heparin-Vollblut für 20 min bei 37 °C mit den Testsubstanzen vorinkubiert und anschließend mit A23187 [30 µM] für weitere 10 min stimuliert. Als Kontrollinhibitor wurde der etablierte direkte 5-LO-Inhibitor Zileuton [3 µM] gewählt. Es wurden analog zu den Untersuchungen in Monozyten Heatmaps (**Abb. 28** links) erstellt und charakteristische Metabolite der verschiedenen Stoffwechselwege zur Bestimmung der jeweiligen Enzymaktivität in Balkendiagrammen (rechts) dargestellt. **Abb. 28 A** zeigt das LM-Profil für CTA1 und CTA2 und **Abb. 28 B** für SZK1 und SZK5. Die Daten wurden in Bezug zur DMSO-Kontrolle (auf 100% gesetzt) dargestellt. Als Kontrollinhibitor diente Zileuton [3 µM]. Die farbliche Skalierung der Heatmaps stellt analog zu den Untersuchungen in Monozyten eine verminderte Produktionsrate in Blautönen und eine verstärkte Synthese in Rottönen dar. Die Balkendiagramme zeigen die DMSO-Kontrolle in Weiß, die getesteten Substanzen in Schwarz und den Kontrollinhibitor Zileuton in Grau.

Anders als in Monozyten zeigten SZK1 und SZK5 (**Abb. 28 B**) in Vollblut keine inhibitorische Wirkung, weder auf die Synthese der Produkte der 5-LO (5-HETE, LTB₄ und LTC₄) noch auf die der COX/mPGES-1 (PGE₂) oder die der 15-LO (15-HETE). Dies ist auch in den eher blassen Farben der Heatmap erkennbar, deren Werte sich größtenteils im 100%-Bereich bewegen. Anders verhielt es sich mit den Substanzen CTA1 und CTA2 (**Abb. 28 A**). Diese wiesen, wie auch in Monozyten, zwar keinen Einfluss auf die Aktivität der 15-LO (15-HETE) und die COX (PGE₂), jedoch auf die LT-Biosynthese auf. So zeigen die in der Heatmap überwiegend in Blau dargestellten Daten eine deutlich verminderte Produktionsrate der 5-LO-Produkte wie 5-HETE, LTB₄ und LTC₄. Dabei lässt sich eine etwas stärkere Inhibition durch CTA1 erkennen. Die zugehörigen Balkendiagramme veranschaulichen die um ~60% verminderte Syntheserate sowohl von 5-HETE als auch von LTB₄ unter dem Einfluss von CTA1 [10 µM]. Die LTC₄-Synthese wurde sogar um 82,8% gehemmt. Bei einer Konzentration von 3 µM inhibierte CTA1 die LTC₄-Produktbildung immer noch um 59,7%. Nur der Kontrollinhibitor Zileuton [3 µM] wies mit einer Inhibition um 68,2% einen deutlicheren Effekt auf. Die inhibitorische Wirkung von CTA2 in Vollblut fiel insgesamt geringer aus als die von CTA1. Der stärkste Effekt wurde auch hier auf die Synthese von LTC₄, mit einer Hemmung um 69,4% bei einer Konzentration von 30 µM, verzeichnet. Bei 3 µM konnte die Aktivität noch um ~40% vermindert werden. Die Bildung von LTB₄ und 5-HETE wurde nur um ~40% bei 30 µM gehemmt, die Konzentration von 3 µM führte zu keiner nennenswerten Inhibition.

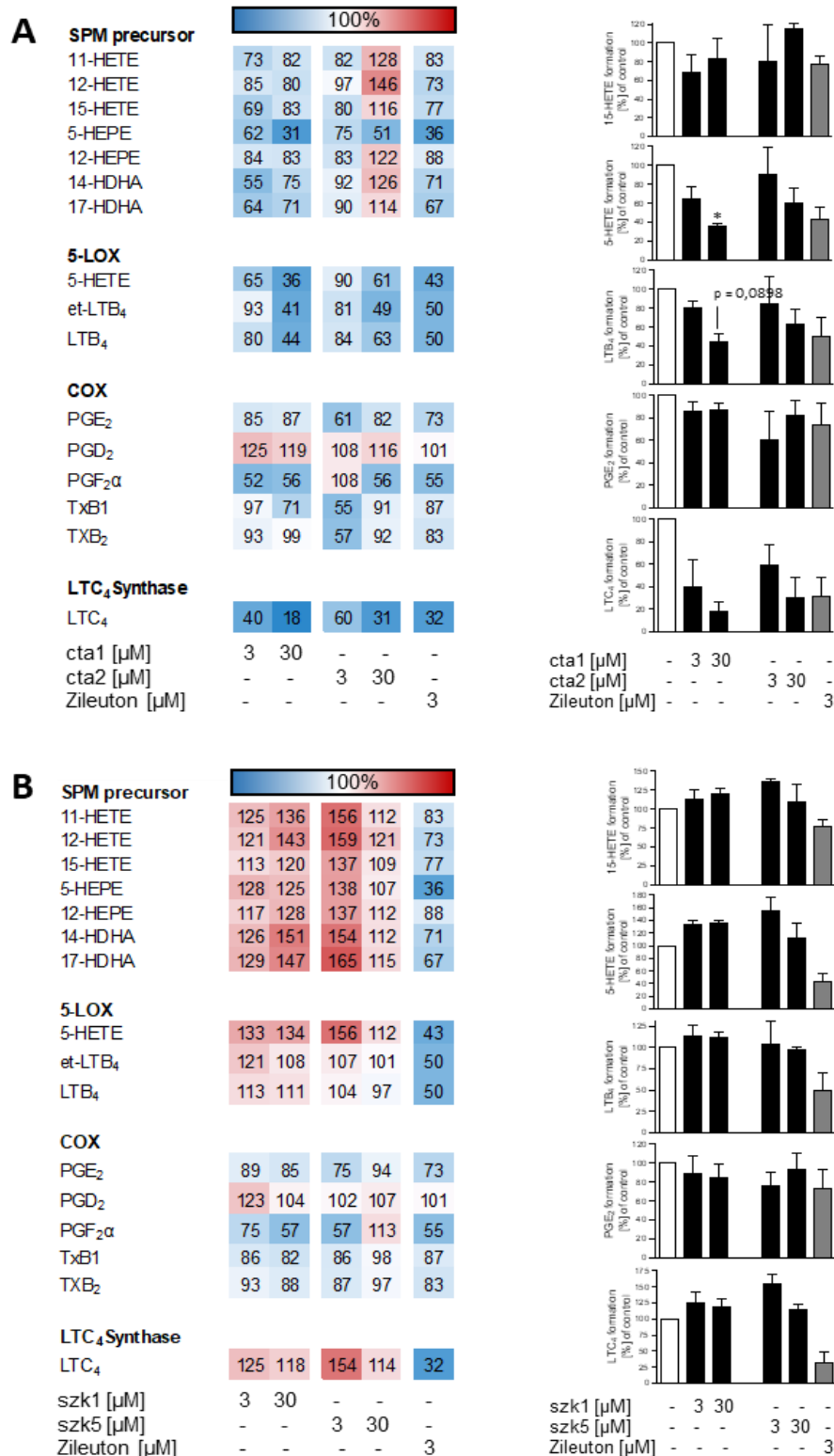


Abb. 28: Einfluss von CTA1 und CTA2 (A) sowie von SZK1 und SZK5 (B) auf die Produktbildung verschiedener Enzyme des AA-Stoffwechsels in humanem Vollblut.

Heparin-Vollblut (1 ml) wurde 20 min mit den Testsubstanzen CTA1, CTA2 (A), SZK1 oder SZK5 (B) bei 37 °C vorinkubiert und für 10 min mit A23187 [30 μM] stimuliert. Die Quantifizierung der LM erfolgte nach Festphasenextraktion über RP-C18-Extraktionssäulen mittels LC-MS/MS. Kontrollinhibitor: Zileuton [3 μM]. n=3. Die Werte sind in Prozent zu Vehikel (0,1% DMSO) als Mittelwert + SEM angegeben. Für die statistische Analyse wurden die Werte logarithmiert und ein ungepaarter t-Test durchgeführt. p < 0,05 (*).

4.2.5 Evaluation der direkten Hemmung der COX-1 und der COX-2 durch duale mPGES-1/LTC₄S-Inhibitoren

In Vorversuchen war durch Vincenza Cantone bereits die Wirkung der Substanzen CTA2, SZK1 und SZK5 auf die Aktivität der isolierten COX-1 und COX-2 getestet worden: CTA2 zeigte dabei eine Inhibition der COX-1 bei 10 μ M, SZK5 bereits bei 3 μ M. SZK1 hatte keinen Einfluss auf die COX-1-vermittelte 12-HHT-Synthese. In Untersuchungen an rekombinanter COX-2 konnte für keine der Substanzen ein inhibitorischer Effekt nachgewiesen werden.

Um abschließend die Wirkung von CTA1 auf die PG-Biosynthese evaluieren zu können, wurde isolierte COX-1 [50 U/ml] bzw. COX-2 [20 U/ml] mit CTA1 für 5 min bei RT vorinkubiert und anschließend für weitere 5 min mit AA (COX-1 [5 μ M], COX-2 [2 μ M]) bei 37 °C stimuliert. 12-HHT wurde als Endprodukt mittels HPLC quantifiziert.

Die 12-HHT-Bildung unter dem Einfluss von CTA1 ist in den Balkendiagrammen in **Abb. 29** dargestellt. Dabei zeigt **Abb. 29 A** die COX-1-vermittelte, **Abb. 29 B** die COX-2-vermittelte Produktbildung. Die DMSO-Kontrolle (gesetzt 100%) ist in Weiß, die Testsubstanz CTA1 in den Konzentrationen 1, 3 und 10 μ M sowie die Kontrollinhibitoren Indometacin [10 μ M] und Celecoxib [1 μ M] sind in Schwarz dargestellt. Sowohl bei der Untersuchung der Aktivität der COX-1 (**Abb. 29 A**) als auch der COX-2 (**Abb. 29 B**) war keine Inhibition durch CTA1 zu erkennen. Die Synthese von 12-HHT stieg im Gegenteil sogar mit zunehmender Konzentration von CTA1 an: an isolierter COX-1 bis auf das 2,5-fache (229% bei 10 μ M), an rekombinanter COX-2 um 29,2%. Der Referenzinhibitor Indometacin [10 μ M] verminderte die Syntheserate von 12-HHT in den Untersuchungen mit rekombinanter COX-1 signifikant um 72,6%, in den Versuchen mit COX-2 um 56,7%. Der selektive COX-2-Inhibitor Celecoxib führte zu einer signifikanten Hemmung der Aktivität um 48,1%.

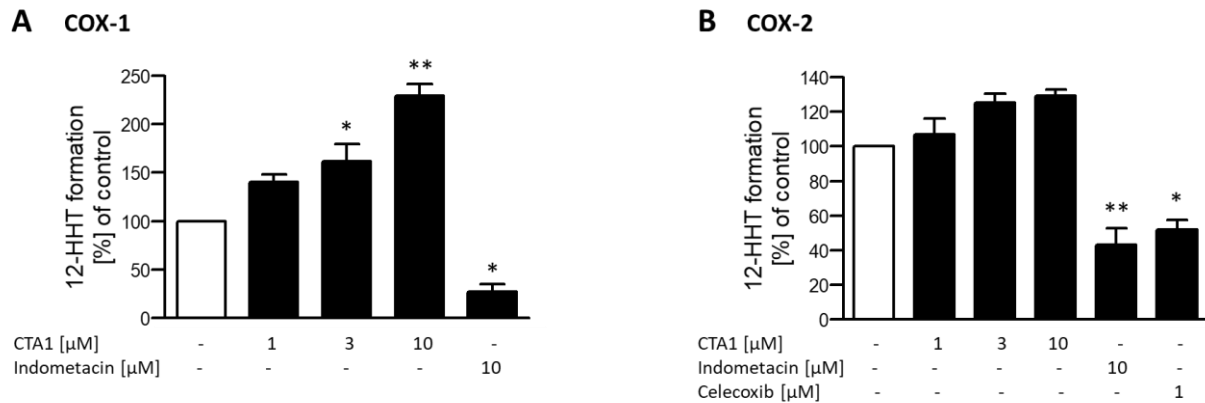


Abb. 29: Einfluss von CTA1 auf die 12-HHT-Produktbildung an isolierter COX-1 (A) und COX-2 (B).

Isolierte COX-1 [50 U/ml] bzw. COX-2 [20 U/ml] wurde mit der Testsubstanz CTA1 5 min bei RT im Inkubationsansatz vorinkubiert. Es folgte die Stimulation mit AA (5 μ M (COX-1) bzw. 2 μ M (COX-2)) für 5 min. Die Bestimmung der 12-HHT-Bildung erfolgte nach Festphasenextraktion über RP-C18-Extraktionssäulen mittels HPLC. Kontrollinhibitor: Indometacin [10 μ M] (\pm Celecoxib [1 μ M]). $n=3$. Die Werte sind in Prozent zu Vehikel (0,1% DMSO) als Mittelwert + SEM angegeben. Für die statistische Analyse wurden die Werte logarithmiert und eine einfaktorielle ANOVA mit Dunnett's Post-hoc-Test (für CTA1) bzw. ein ungepaarter t-Test (für Indometacin und Celecoxib) durchgeführt. $p < 0,01$ (**), $p < 0,05$ (*).

4.2.6 Evaluation der Interaktion zwischen 5-LO und FLAP durch duale mPGES-1/LTC₄S-Inhibitoren

Die Untersuchung des Einflusses der dualen mPGES-1/LTC₄S-Inhibitoren auf die Interaktion zwischen der 5-LO und dem FLAP wurde mittels „Proximity Ligation Assay“ (PLA) analysiert. Dazu wurden Monozyten (1×10^6 /ml) mit den Testsubstanzen [3 μ M] zur Inkubation bei 37 °C auf Deckgläschen in CaCl₂-PBS-Puffer [1 mM] angesetzt. Nach 10 min wurden die Zellen mit A23187 [2,5 μ M] für 20 min bei 37 °C stimuliert und anschließend auf den Deckgläschen mit PFA [4%] fixiert. Nach Permeabilisation wurden die Zellen über Nacht mit dem Primärantikörper (mouse anti-5-LO [1:100] und rabbit anti-FLAP [1:150]) inkubiert und am darauffolgenden Tag mit den PLA-Sonden (anti-mouse MINUS und anti-rabbit PLUS) versetzt. Die Zugabe einer Ligase verband die Sonden unter der Voraussetzung, dass die Oligonukleotide nicht mehr als 40 nm voneinander entfernt lagen. Nach Amplifikation dieser Struktur konnte die Protein-Protein-Interaktion unter dem Mikroskop visualisiert werden.

Abb. 30 A zeigt die Ergebnisse für CTA1 und CTA2, **Abb. 30 B** für SZK1 und SZK5 bei einer Wellenlänge von 555 nm und einer 40-fachen Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop (Zeiss-Axiovert 200M). Die Zellkerne sind durch die Anfärbung mit DAPI blau dargestellt. In der

unstimulierten Probe (DMSO-Kontrolle) sind, wie erwartet, nur die blauen Zellkerne erkennbar. Nach Stimulation der Probe mit A23187 sind deutlich magentafarben fluoreszierende Signale sichtbar, welche auf eine Interaktion zwischen der 5-LO und dem FLAP hinweisen. Als Positiv-Kontrolle diente der FLAP-Inhibitor MK886 [1 μ M], von dem bekannt ist, dass dieser die 5-LO/FLAP-Interaktion hemmt (Gerstmeier et al. 2016a). Während CTA1 die Interaktion im Gegensatz zur A23187-stimulierten Kontrolle nur geringfügig verringerte, konnte bei keiner der anderen Substanzen (CTA2, SZK1 oder SZK5) eine Interaktion (magenta fluoreszierende Signale) detektiert werden.

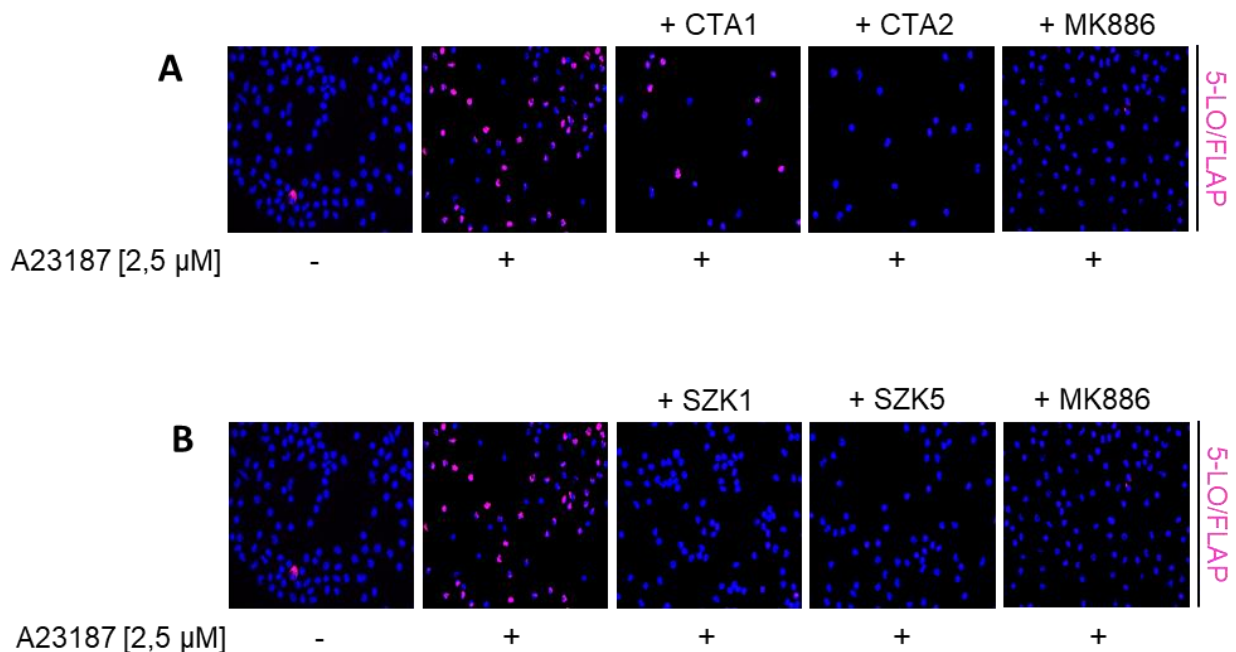
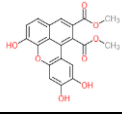
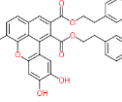
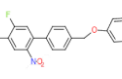
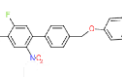


Abb. 30: Einfluss der Substanzen CTA1 und CTA2 (A) sowie SZK1 und SZK5 (B) auf die Interaktion zwischen 5-LO und FLAP in Monozyten.

Monozyten (1×10^6 /ml) wurden auf Deckgläschen mit den Testsubstanzen [3 μ M], dem Kontrollinhibitor MK886 [1 μ M] oder dem Vehikel DMSO [0,1%] 10 min bei 37 °C in CaCl_2 -PBS-Puffer [1 mM] vorinkubiert und anschließend mit A23187 [2,5 μ M] für 20 min bei 37 °C stimuliert, mit 4%igem PFA fixiert und anschließend permeabilisiert. Nach Blocken unspezifischer Bindungsstellen wurden die Zellen mit den Primärantikörpern (mouse anti-5-LO [1:100] und rabbit anti-FLAP [1:150]) über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit den PLA-Sonden (anti-mouse MINUS und anti-rabbit PLUS) inkubiert. Es folgte die Inkubation mit einer Ligase für 30 min bei 37 °C und anschließender Amplifikation mit Polymerase (100 min, 37 °C im Dunkeln). Die Abbildung zeigt die Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskop (Zeiss-Axiovert-200M) bei 555 nm Wellenlänge und 40-facher Vergrößerung. $n=3$. Der Zellkern ist durch die Anfärbung mit DAPI blau sichtbar, in Magenta erscheint der Komplex aus 5-LO und FLAP.

In **Tab. 4** ist eine Übersicht über die Ergebnisse der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche mit den getesteten dualen mPGES-1/LTC₄S-Inhibitoren dargestellt.

Tab. 4: Übersicht über die inhibitorischen Wirkungen der dualen mPGES-1/LTC₄S-Inhibitoren auf Enzyme des AA-Stoffwechsels.

	Struktur	IC ₅₀ mPGES-1 (i.E.)	IC ₅₀ LTC ₄ S (i.E.)	IC ₅₀ 5-LO (i.E.)	IC ₅₀ 5-LO (PMNL)	5-LO (Monozyten)	5-LO (Vollblut)	PLA	COX-1 (i.E.)	COX-2 (i.E.)
CTA1		3.40 µM	3.81 µM	0.17 µM	1.8 µM	≥ 1 µM	≥ 3 µM	(-)	-	-
CTA2		0.63 µM	0.47 µM	0.04 µM	1.1 µM	≥ 1 µM	≥ 3 µM	≥ 3 µM	≥ 10 µM	-
SZK1		0.25 µM	1.68 µM	-	3.93 µM	≥ 1 µM	-	≥ 3 µM	-	-
SZK5		0.18 µM	0.93 µM	≥ 3 µM	1.40 µM	≥ 1 µM	-	≥ 3 µM	≥ 3 µM	-

5. DISKUSSION

Entzündliche Vorgänge spielen eine große Rolle bei einer Vielzahl von sowohl akuten als auch chronischen Erkrankungen. So ist die Therapie der Inflammation beispielsweise bei Patienten, die an Asthma, COPD oder rheumatoider Arthritis leiden, eine grundlegende Maßnahme zur Verbesserung ihrer Symptome (Shah et al. 2017). Der dabei zugrunde liegende Mechanismus, die Hemmung der Synthese bestimmter LM, ist weitestgehend gut erforscht, jedoch ist die Nachfrage nach neuen Wirkstoffen mit geringeren Nebenwirkungen als die der momentan auf dem Markt erhältlichen antiinflammatorischen Therapeutika hoch. In den Fokus der Forschung rücken dabei immer mehr pflanzliche Therapeutika, welche in der Volksmedizin eingesetzt werden. Dabei spielt nicht nur der Kostenfaktor eine Rolle, sondern vor allem die höhere Effektivität bei geringerem Nebenwirkungsprofil (Koeberle und Werz 2018). Zum einen wird durch die Synthese von Substanzen mit selektiver Hemmung einzelner LM, wodurch physiologisch relevante LM unbeeinträchtigt synthetisiert werden können, versucht, die Nebenwirkungen möglichst gering zu halten. Zum anderen werden den dualen Inhibitoren des COX- und 5-LO-Weges vielversprechende Wirkungen zugesprochen, da durch die Blockade dieser beiden Hauptstoffwechselwege der AA die Synthese sowohl der proinflammatorischen PG als auch der LT inhibiert wird (Hwang et al. 2013, Meirer et al. 2014). Aufgrund der Nachteile der momentan auf dem Markt verfügbaren antiinflammatorischer Wirkstoffe beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Charakterisierung sowohl neuer synthetischer als auch pflanzlicher Wirkstoffe mit unterschiedlichen Angriffspunkten in der Eikosanoidbiosynthese.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden vier in Sri Lanka beheimatete Pflanzen untersucht, welche seit langem in der traditionellen asiatischen Volksmedizin Anwendung finden: *Garcinia cambogia*, *Pothos scandens*, *Nyctanthes arbor-tristis* und *Plectranthus zeylanicus*. Die Inhaltsstoffe dieser Pflanzen wurden mit den Extraktionsmitteln Hexan, DCM, EtOAc und MeOH (siehe Kapitel 1.4, **Tab. 1**) extrahiert, das Lösungsmittel verdampft, die Extrakte getrocknet und anschließend in DMSO (0,1%) aufgenommen. Die so erhaltenen Inhaltsstoffe wurden auf eine Hemmung der LT- und PG-Biosynthese hin untersucht. Zunächst wurden die Pflanzenextrakte in einem Grobscreening in den Konzentrationen 3 und 30 µg/ml getestet. Bei Hemmung der Enzymaktivität unter 50% wurde der IC₅₀-Wert der Extrakte sowohl am rekombinanten Enzym als auch in zellulären Systemen bestimmt.

Für die Analyse der Hemmwirkung auf die 5-LO-Aktivität wurden zunächst PMNL als Testsystem gewählt, welche 10 min mit A23187 [2,5 µM] und AA [20 µM] stimuliert wurden. Die Quantifizierung der 5-LO-Produkte (trans-LTB₄, epitrans-LTB₄, LTB₄ und 5-HETE) mittels HPLC lieferte erfolversprechende Werte für die Extrakte 1-3 aus GC und die Extrakte 8 und 20 aus PL: GC 1-3 konnten die Aktivität der 5-LO bei einer Konzentration von 3 µg/ml um > 95% hemmen, PL-8 inhibierte die 5-LO-Aktivität bei 3 µg/ml um > 60%, PL-20 um > 75% (**Abb. 17**). Aufgrund dieser Befunde wurden die IC₅₀-Werte der Extrakte GC 1-3, PL-8 und PL-20 bestimmt.

Zunächst diente die Untersuchung an rekombinanter 5-LO der Klassifizierung der ausgewählten Extrakte in direkte und indirekte 5-LO-Inhibitoren. Dazu wurde rekombinante 5-LO verwendet und nach Zugabe der Testsubstanzen für 10 min mit CaCl₂ [2 mM] und AA [20 µM] stimuliert. Den niedrigsten IC₅₀-Wert aus GC zeigte der Hexanextrakt (GC-1) mit 0,15 µg/ml. Für PL war der Extrakt PL-20 der potenteste, mit einem IC₅₀-Wert von 0,12 µg/ml (**Abb. 18**). Die starke Hemmung der rekombinanten 5-LO lässt auf eine direkte 5-LO-Inhibition schließen. Die geringen IC₅₀-Werte gaben Anlass zur weiteren Charakterisierung, denn obwohl viele Pflanzen als Inhibitoren der 5-LO diskutiert werden, ist deren Potenz deutlich geringer. Für viele lipophile Extrakte liegt der IC₅₀-Wert für rekombinante 5-LO bei ~20-30 µg/ml (Li et al. 2003, Schneider und Bucar 2005), was die in den vorliegenden Versuchen ermittelten sehr geringen Werte (< 2 µM) in ihrer Bedeutung für die weitere Forschung hervorhebt. Diese potente Inhibition zeigte sich auch in den Versuchen mit humanen PMNL, deren Produktbildung nach 10-minütiger Stimulation mit A23187 [2,5 µM] und AA [20 µM] ebenfalls über die HPLC quantifiziert wurde. Wie erwartet fielen die IC₅₀-Werte höher aus als in den Versuchen am isolierten Enzym. Enzyme sind in Zellen oft an andere Bestandteile gebunden und können dadurch mehr oder weniger stark in ihren Eigenschaften beeinflusst werden. Aber auch in PMNL lagen die IC₅₀-Werte zwischen 1 und 5 µg/ml (**Abb. 19**) und somit deutlich unter den meist zweistelligen IC₅₀-Werten bisher getesteter Pflanzenextrakte (Schneider und Bucar 2005).

Die vorliegenden Ergebnisse lassen vermuten, dass es sich bei den aus GC und PL extrahierten Wirkstoffen um lipophile Bestandteile handelt, die sich mit ansteigender Lipophilie der Extraktionsmittel verstärkt extrahieren lassen. Dies zeigt sich an der starken 5-LO-Inhibition durch GC 1-3, welche mit den lipophilen Extraktionsmitteln Hexan, DCM und EtOAc extrahiert wurden. Der Extrakt GC-4, welcher mit dem hydrophileren Extraktionsmittel MeOH gewonnen wurde, wies keine 5-LO-inhibitorischen Effekte auf. Auch die Extrakte aus PL

wurden mit Hexan oder DCM extrahiert und zeigten eine potente Inhibition dieses Enzyms, was ebenfalls auf lipophile Inhaltsstoffe schließen lässt. Weiterhin lässt sich aufgrund der Ergebnisse vermuten, dass PL-8 und PL-20 als pure Extrakte vorliegen, da alle Fraktionen die 5-LO-Aktivität im Grobscreening bei 30 µg/ml um 100% hemmten, jedoch nur PL-8 und PL-20 auch bei 3 µg/ml noch eine Inhibition um > 60% (PL-8) bzw. > 75% (PL-20) zeigten (**Abb. 17 D**). Die hohe Potenz der hier untersuchten Extrakte der Pflanzen GC und PL verdeutlicht ein Vergleich mit der ebenfalls aus Asien stammenden Pflanze *Leucas zeylanica*. Für den lipophilen, ebenfalls in DCM extrahierten Extrakt aus *Leucas zeylanica* wurde an isolierter 5-LO ein IC₅₀-Wert von 2,2 µg/ml ermittelt und in stimulierten PMNL von 5,5 µg/ml (Napagoda et al. 2018). Der DCM-Extrakt aus GC inhibierte im Vergleich dazu die 5-LO-Aktivität mit einem IC₅₀-Wert von 0,16 µg/ml am isolierten Enzym (**Abb. 18 A**) und mit einem IC₅₀-Wert von 1,39 µg/ml in PMNL (**Abb. 19 A**) deutlich stärker als *Leucas zeylanica* bzw. es war eine niedrigere Dosis des GC-Extrakts für denselben Effekt ausreichend. Dies ist für die weitere pharmakologische Verwendung von großer Bedeutung. Im Hinblick auf den hemmenden Effekt von PL ist der Vergleich mit *Leucas zeylanica* ebenfalls interessant, da beide Pflanzen der Familie der *Lamiaceae* angehörig sind. Zudem wurden sowohl PL-8 als auch PL-20 wie auch *Leucas zeylanica* mit DCM extrahiert. Dabei zeigt der direkte Vergleich der Extrakte aus PL mit dem aus *Leucas zeylanica* ebenfalls deutlich niedrigere IC₅₀-Werte für die Extrakte aus PL sowohl am isolierten Enzym (IC₅₀ = 1,29 µg/ml (PL-8) und 0,12 µg/ml (PL-20) (**Abb. 18 B**)) als auch in PMNL (IC₅₀ = 5,31 µg/ml für PL-8 und IC₅₀ = 1,70 µg/ml für PL-20 (**Abb. 19 B**)).

Auch der Einfluss der Pflanzenextrakte auf die mPGES-1-Aktivität und damit auf die PG-Biosynthese wurde zunächst mittels eines Grobscreenings (Untersuchung in den Konzentrationen 3 und 30 µg/ml) evaluiert. Dafür wurden in einem etablierten zellfreien System (Koeberle et al. 2008) A549-Mikrosomen nach Inkubation mit den Pflanzenextrakten für 1 min mit dem Substrat PGH₂ [60,4 nM] zur PGE₂-Bildung stimuliert und dieses anschließend über die HPLC quantifiziert. Die Auswertung ergab für die Extrakte GC 1-3 sowie POT 1-4 bei einer Konzentration von 3 µg/ml eine Hemmung der mPGES-1-Aktivität um > 75% (**Abb. 20**). Unter Einbeziehung der Ergebnisse aus den Untersuchungen mit der 5-LO kristallisiert sich heraus, dass die GC-Extrakte duale Hemmer der 5-LO und mPGES-1 darstellen. Diese duale Inhibition wurde von Celotti und Laufer als ein Konzept mit sehr günstigem Nebenwirkungsprofil bewertet. So wird erwartet, dass entsprechende Hemmstoffe z.B. eine verminderte Gastrototoxizität, im Vergleich zu den NSAR und Coxiben aufweisen (Celotti und Laufer 2001). Ob die Extrakte aus GC auch eine Wirkung auf andere Enzyme des

AA-Stoffwechsels haben, bleibt zu erforschen. Die Extrakte aus SF und PL konnten bei einer Konzentration von 3 µg/ml die PGE₂-Synthese nicht um > 50% senken, weshalb nur GC 1-3 und POT 1-4 zur weiteren Charakterisierung ausgewählt wurden. Für GC 1-3 wurden dabei hinsichtlich der mPGES-1-Aktivität mit < 1 µg/ml sehr niedrige IC₅₀-Werte ermittelt (**Abb. 21 A**). Die Extrakte POT 1-4 zeigten ebenfalls eine sehr starke Inhibition der mPGES-1 (IC₅₀ < 0,5 µg/ml (**Abb. 21 B**)), welche noch deutlicher als die der GC-Extrakte ausfiel. Da auch der mit dem hydrophileren Extraktionsmittel MeOH erzeugte Extrakt aus POT (POT-4) erfolgversprechende Werte zeigte, liegt die Vermutung nahe, dass dieser Extrakt sowohl lipophile als auch hydrophile Komponenten aufweist. Dies ist für weitere Untersuchungen in humanem Vollblut und *in vivo* interessant. Es lässt sich aufgrund der bisherigen Datenlage vermuten, dass die POT-Extrakte *in vivo* die potenteste Hemmwirkung erreichen dürften, da die Plasmaproteinbindung aufgrund des weniger lipophilen Charakters des Extrakts nicht so hoch ausfallen dürfte wie bei den lipophilen Substanzen wie z.B. den GC-Extrakten.

Die selektive mPGES-1-Inhibition, wie sie bei den POT-Extrakten beobachtet wurde, stellt in der Therapie der Inflammation ein ebenfalls vielversprechendes Konzept dar. PGE₂ ist eines der wichtigsten proinflammatorischen LM, welches durch verschiedene Stimuli bei Krebs- und Herzerkrankungen sowie im Entzündungsgeschehen vermehrt synthetisiert wird (Koeberle und Werz 2015, Psarra et al. 2017). Aufgrund der oftmals gekoppelten Induktion der mPGES-1 und der COX-2 und der verstärkten Expression der COX-2 in entzündeten Gebieten wird die PGE₂-Synthese durch selektive mPGES-1-Inhibitoren nur dort inhibiert, wodurch die physiologisch relevante COX-1-vermittelte PGE₂-Synthese unbeeinflusst bleibt (Murakami et al. 2000). Dies hebt die Relevanz der bei den POT-Extrakten ermittelten Daten hervor, welche aufgrund der sehr niedrigen IC₅₀-Werte (< 0,5 µg/ml) unbedingt in zellulären Systemen getestet werden sollten. Verglichen mit dem Extrakt aus *Leucas zeylanica*, welcher nicht nur einen inhibitorischen Einfluss auf die 5-LO hat, sondern mit einem IC₅₀-Wert von 0,4 µg/ml (Napagoda et al. 2018) auch die mPGES-1 hemmt, und damit ebenfalls wie die GC-Extrakte einen dualen Inhibitor darstellt, zeigen die vorliegenden Daten zu GC-2 (Extraktionsmittel DCM) einen ebenso potenten Effekt (IC₅₀ = 0,49 µg/ml) (**Abb. 21 A**). Der Extrakt POT-2 führte sogar zu einer deutlich stärkeren Inhibition der mPGES-1 als der Extrakt aus *Leucas zeylanica* (IC₅₀ = 0,27 µg/ml (**Abb. 21 B**)).

Abschließend lässt sich zu den Pflanzenextrakten aus Sri Lanka sagen, dass SF die geringste Hemmwirkung auf die 5-LO- und mPGES-1-Hemmung gezeigt hat. Nur der Hexanextrakt wies bei 30 µM einen geringen inhibitorischen Effekt auf (**Abb. 17 C** und **Abb. 20 C**). Aus diesem

Grund eignet sich dieser Extrakt nicht als Therapeutikum mit Angriff an diesen beiden Enzymen und wurde daher in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich einer LM-Synthese-Inhibierung nicht weiter verfolgt. In der Literatur zeigt die Pflanze dennoch antiinflammatorische und antipyretische Effekte (Agrawal und Pal 2013), was darauf schließen lässt, dass sie ihre Wirkung über einen anderen Mechanismus entfaltet. Die Extrakte aus GC, POT und PL sollten aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse in weiteren Zellsystemen und auf ihre Zytotoxizität getestet werden, um nachfolgend *in vivo*-Experimente durchführen zu können. Zudem sollten die Extrakte bezüglich ihres Einflusses auf andere Enzyme des AA-Stoffwechsels überprüft werden, um Wechselwirkungen bzw. Nebenwirkungen über diese Enzyme auszuschließen. Die GC-Extrakte könnten als duale Inhibitoren der 5-LO und mPGES-1 einen zentralen Bestandteil in der zukünftigen Forschung einnehmen, da das Konzept der dualen Enzyminhibition geringere Nebenwirkungen bei hoher antiinflammatorischer Effektivität verspricht (Koeberle und Werz 2015). Für PL wurden neben den in der vorliegenden Arbeit beobachteten antiinflammatorischen Eigenschaften auch antimikrobielle Wirkungen beschrieben (Napagoda et al. 2017), was eine mögliche Korrelation zwischen diesen Eigenschaften impliziert. Im Fall von POT legen die Ergebnisse eine genauere Überprüfung der selektiven mPGES-1-Hemmung nahe. Wird dabei eine negative Beeinflussung anderer Enzyme ausgeschlossen, sollte der Extrakt aufgrund seiner sowohl lipo- als auch hydrophilen Eigenschaften in humanem Vollblut und bei weiterhin potenter Inhibition auch *in vivo* getestet werden. Weiterhin wäre eine Entschlüsselung der Struktur der Inhaltsstoffe der Extrakte interessant, um die Struktur-Wirkungsbeziehungen gezielter analysieren zu können. Für PL-8 ist dies bereits erfolgt. Im Max-Planck-Institut für chemische Ökologie in Jena konnte die Struktur mittels UPLC-MS/MS-MS und Kernspinresonanz (syn. nuclear magnetic resonance (NMR)) aufgeklärt werden: Es handelt sich um das Diterpen 7 α -Acetoxy-6 β -Hydroxyroyleanon (Napagoda et. al., unpublizierte Daten).

Im zweiten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurden neu synthetisierte potentiell duale mPGES-1/LTC₄S-Inhibitoren charakterisiert: CTA1 und CTA2 sowie SZK1 und SZK5 (siehe Kapitel 1.5, **Tab. 2**). Die Synthese dieser Inhibitoren wurde an der Universität von Salerno durchgeführt, wobei die Zielstellung zunächst die selektive Hemmung der mPGES-1 war, was anhand eines mPGES-1-Dockingmodells verfolgt wurde. Zusätzliche Anforderungen stellten die Entwicklung kleiner, gut bioverfügbarer Moleküle und deren möglichst einfache Synthese dar. Dies resultierte in einem Brombenzol-Grundgerüst, welches mit weiteren funktionellen Gruppen konjugiert wurde (Di Micco et al. 2018). Aufgrund der Homologie der MAPEG-Familienmitglieder war neben einer potenten Inhibition der mPGES-1 auch ein inhibitorischer Effekt auf die LTC₄S nicht auszuschließen, weshalb die Wirkung der Substanzen auf dieses Enzym ebenfalls getestet wurde (durchgeführt von V. Cantone und S. Liening). Aufgrund der hier erzielten erfolgversprechenden Ergebnisse mit IC₅₀-Werten im unteren einstelligen µM-Bereich (**Tab. 2**) wurden die Substanzen CTA1, CTA2, SZK1 und SZK5 in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich ihrer Zytotoxizität und Hemmwirkung auf weitere LM-bildende Enzyme des AA-Stoffwechsels untersucht.

Um zunächst eine zytotoxische Wirkung der Substanzen auszuschließen und damit eine unbedenkliche Anwendung *in vivo* zu ermöglichen, wurden Monozyten als zelluläres Testsystem gewählt. Nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit den zu testenden Substanzen konnte bei einer Konzentration von 3 µM weder für CTA1 und CTA2, noch für SZK1 und SZK5 ein negativer Einfluss auf die metabolische Aktivität der Monozyten festgestellt werden (**Abb. 22**). Die lange Inkubationszeit von 24 Stunden liegt deutlich über den 15 bzw. 20 min, welche für alle weiteren Versuche zur Stimulation der LM-Biosynthese verwendet wurde. Diese lange Periode ist jedoch notwendig, um die Substanzen zukünftig in möglichen *in vivo*-Experimenten untersuchen zu können (Pace et al. 2017). Die positiven Ergebnisse der Untersuchungen in Monozyten lassen sich jedoch nicht ohne weiteres auf andere zelluläre Systeme übertragen, weshalb die Substanzen vor der Anwendung *in vivo* in weiteren Zellen bzw. in humanem Vollblut auf ihre Zytotoxizität getestet werden sollten. Weiterhin wäre von Interesse zu untersuchen, ob die Substanzen einen zytotoxischen Effekt auf Krebszelllinien wie beispielsweise auf HL60-Zellen (Gallagher et al. 1979) zeigen, was von großer Bedeutung für die Krebsforschung wäre (Li et al. 2012).

Nachfolgend wurde die Wirkung der Substanzen auf das Schlüsselenzym der LT-Biosynthese, die 5-LO, untersucht. Zunächst diente die Analyse am isolierten Enzym der Klassifizierung der

Hemmstoffe in direkte und indirekte 5-LO-Inhibitoren. Dazu wurde rekombinante 5-LO verwendet. Nach Zugabe der Testsubstanzen für 10 min wurde das Enzym mit CaCl_2 [2 mM] und AA [20 μM] zur LT-Biosynthese stimuliert. CTA1 ($\text{IC}_{50} = 0,17 \mu\text{M}$ (**Abb. 23 A**)) und CTA2 ($\text{IC}_{50} = 0,04 \mu\text{M}$ (**Abb. 23 B**)) konnten die Aktivität der 5-LO deutlich senken, was auf eine direkte 5-LO-Inhibition schließen lässt. Die Substanz SZK5 (inhibitorischer Effekt bei $< 3 \mu\text{M}$) (Cantone et al., unpublizierte Daten) scheint ebenfalls ein direkter Hemmstoff der 5-LO zu sein. Für SZK1 wurde selbst bei $> 10 \mu\text{M}$ kein inhibitorischer Effekt auf die 5-LO-Aktivität beobachtet (Cantone et al., unpublizierte Daten) was impliziert, dass diese Substanz kein direkter 5-LO-Inhibitor ist. Da für SZK1 jedoch in zellulären Systemen wie humanen PMNL und Monozyten (**Abb. 27**) eine starke LT-Hemmung zu beobachten war, wäre eine Hemmung des 5-LO-Helferproteins FLAP oder die Inhibition der AA-freisetzenden cPLA₂ denkbar (Gerstmeier et al. 2016a). Um diese Hypothesen zu untersuchen, wurden die Substanzen weiter hinsichtlich ihres Einflusses auf die 5-LO-Hemmung in zellulären Systemen (PMNL, Monozyten und Vollblut) unter verschiedenen Stimulationsbedingungen getestet. Zu beobachten war eine Abnahme des inhibitorischen Einflusses auf die 5-LO-Aktivität in allen getesteten zellulären Systemen (PMNL: **Abb. 24**, Monozyten: **Abb. 26** und **Abb. 27**, Vollblut: **Abb. 28**) im Vergleich zu den Untersuchungen an isolierter 5-LO, was an den deutlich höheren IC_{50} -Werten ersichtlich ist. Ein Zusammenhang mit der Polarität der Substanzen ist hier denkbar. Insbesondere SZK1 und SZK5, jedoch auch CTA1 und CTA2, weisen durch ihre Fluorgruppen (SZK) bzw. Benzolringe (CTA) sehr lipophile Eigenschaften auf, was mit einer schlechteren Membrangängigkeit korreliert und eine Bindung an Plasmaproteine wie z.B. Albumin bedingt.

Weitere Untersuchungen in PMNL, nach Stimulation mit A23187 [2,5 μM] für 10 min, ergaben für die 5-LO-Aktivität IC_{50} -Werte von 1,72 μM (CTA1) und 0,70 μM (CTA2) (**Abb. 24**). Die zusätzliche Stimulation der Zellen mit exogener AA [20 μM] ermöglichte es, den inhibitorischen Effekt auf die 5-LO von der auf die cPLA₂ und das Helferprotein FLAP abzugrenzen. Da der inhibitorische Effekt auch nach Zugabe exogener AA noch nachweisbar war und sich ähnliche IC_{50} -Werte ergaben wie ohne Zugabe exogener AA (CTA1: $\text{IC}_{50} = 0,98 \mu\text{M}$, CTA2: $\text{IC}_{50} = 0,21 \mu\text{M}$ (**Abb. 24**)), kann ein zusätzlicher Einfluss der Substanzen auf die cPLA₂ ausgeschlossen werden. Für die Substanz SZK1 wurde in PMNL, stimuliert mit A23187 [2,5 μM], ein IC_{50} -Wert von 3,93 μM und für SZK5 von 1,40 μM ermittelt (Cantone et al., unpublizierte Daten). Verglichen mit dem einzig auf dem Markt etablierten direkten oralen 5-LO-Inhibitor Zileuton, der bei 3 μM die Aktivität des Enzyms um ~65% (Stimulation mit

A23187) bzw. um ~45% (Stimulation mit A23187 + AA) senkte, zeigten die Substanzen CTA1 und CTA2 sowie SZK5 eine deutlich stärkere Inhibition der 5-LO-Aktivität, was das Interesse der Forschung an diesen Substanzen steigern dürfte. Dabei scheint CTA2 in PMNL der potenteste 5-LO-Inhibitor unter den untersuchten Substanzen zu sein. Verglichen mit neueren direkten 5-LO-Inhibitoren (Steinhilber und Hofmann 2014, Werz et al. 2017) können CTA1 und CTA2 aufgrund der Potenz ihrer Inhibition durchaus mit einigen der bereits beschriebenen Substanzen konkurrieren.

Zusätzlich wurde ebenfalls in PMNL nach Stimulation mit A23187 [2,5 μ M] + AA [20 μ M] für 10 min die Wirkung von CTA1 und CTA2 auf die Biosynthese der antiinflammatorisch wirkenden LM 12- und 15-HETE durch die 12- bzw. 15-LO untersucht. Während die 5-LO-Aktivität durch die Testsubstanzen potent inhibiert wurde ($IC_{50} < 1 \mu$ M), zeigte sich eine signifikante Hemmung der 12- und 15-LO-Aktivität erst bei deutlich höheren Konzentration über 3 μ M (**Abb. 25**). Die Produktion der 15-HETE-Syntheserate stieg sogar deutlich an, vermutlich durch die starke Hemmung der 5-LO-Aktivität durch CTA1 und CTA2. Erst ab hohen Konzentrationen von 10 μ M war unter dem Einfluss von CTA1 eine verminderte Synthese der 12-HETE ersichtlich. In diesen Konzentrationen können jedoch unspezifische Effekte nicht ausgeschlossen werden, da dieser Wert 100-fach über dem IC_{50} -Wert für die 5-LO-Hemmung liegt. Die Inhibition proinflammatorischer LT bei gleichzeitig unbeeinflusster bzw. sogar verstärkter Biosynthese der antiinflammatorischen LM (12- und 15-HETE) ist wünschenswert für eine potente entzündungsauflösende Wirkung, die sogenannte Resolution. Zudem zählt 15-HETE als Ausgangsprodukt der LXA₄-Biosynthese, welches als SPM ebenfalls maßgeblich zur körpereigenen Entzündungsbekämpfung beiträgt (Chiang und Serhan 2017). Dieser Weg wird somit durch CTA1 und CTA2 über die vermehrte Biosynthese von 15-HETE begünstigt. Eine genauere Analyse der Wirkungen der Testsubstanzen auf die 15-LO wäre in weiteren Untersuchungen daher wünschenswert, vorzugsweise in antiinflammatorischen M2-Makrophagen, da diese eine verstärkte Expression der 15-LO aufweisen. PMNL zeigen hingegen nur eine geringe 12- und 15-LO-Expression. Der dennoch erkennbare Effekt kann durch die eosinophilen Granulozyten zustande gekommen sein, welche zu den PMNL gehören und reichlich 15-HETE produzieren (Feltenmark et al. 2008). Eine Untersuchung in M2-Makrophagen dürfte jedoch genauere Werte liefern, besonders im Vergleich zu proinflammatorischen M1-Makrophagen, die keine 15-LO exprimieren (Wertz et al. 2018).

Anschließend erfolgte die ausführliche Analyse des LM-Profiles der dualen mPGES-1/LTC₄S-Inhibitoren in humanen Monozyten und Vollblut zur weiteren Charakterisierung der

Testsubstanzen hinsichtlich der 5-LO-Hemmung und des Einflusses auf weitere LM-bildende Enzyme des AA-Stoffwechsels wie z.B. 15-LO, LTA₄-Hydrolase, COX/mPGES-1 und LTC₄S. Dazu wurden Monozyten ($2 \times 10^6/\text{ml}$) nach 15-minütiger Vorinkubation mit den Testsubstanzen mit A23187 [$2,5 \mu\text{M}$] \pm AA [$20 \mu\text{M}$] für 10 min stimuliert. Die Quantifizierung der Metabolite erfolgte mittels UPLC-MS/MS. Die Auswertung des LM-Profiles zeigte, dass CTA1 und CTA2 in Monozyten potent die LT-Biosynthese hemmen (**Abb. 26**). Die 5-LO-Aktivität wurde deutlich vermindert, was sich an der Reduktion der Syntheserate des LTB₄ und der 5-HETE zeigte. Sowohl CTA1 als auch CTA2 hemmten nach einer Stimulation mit A23187 die beiden 5-LO/FLAP-Metabolite bei einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ um $\sim 80\%$ (**Abb. 26 A**). Zusätzlich wurde eine potente zelluläre Inhibition der LTC₄-Biosynthese um $\sim 60\%$ festgestellt. Somit konnten die Substanzen als LTC₄S-Inhibitoren bestätigt werden. Die Zugabe von exogener AA (**Abb. 26 B**) erbrachte, wie zu erwarten und wie bereits bei den Versuchen mit PMNL gezeigt, eine verstärkte Biosynthese der LM. Da sich auch in Monozyten die IC₅₀-Werte für die 5-LO-Hemmung mit und ohne exogener AA ähnelten, kann man vermuten, dass kein zusätzlicher Einfluss der Substanzen auf die Fettsäurefreisetzung durch die cPLA₂ oder auf das Helferprotein FLAP vorliegt. Die Synthese der antiinflammatorischen 15-HETE und anderer SPM wurde, wie auch in PMNL (**Abb. 25**) durch diese Substanzen nicht bzw. nur positiv im Sinne einer vermehrten Biosynthese beeinflusst. Weiterhin wurde PGE₂ ab einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ verstärkt gebildet. Dies zeigt, dass die Affinität der Substanzen gegenüber der 5-LO deutlich höher liegt als für die mPGES-1, deren Inhibition ausschließlich am isolierten Enzym noch nachweisbar war (**Tab. 2**). Die Substanzen SZK1 und SZK5 (**Abb. 27**) hatten auf die Aktivität der 15-LO ebenso wenig Einfluss wie CTA1 und CTA2. In der Inhibition der PGE₂-Biosynthese zeigten SZK1 und SZK5 ebenfalls ähnliche Effekte: So war eine Inhibition durch Stimulation mit A23187 in hohen Konzentrationen noch erkennbar (**Abb. 27 A**), nach Zugabe von exogener AA (**Abb. 27 B**) war ein hemmender Effekt jedoch wie bei den Substanzen CTA1 und CTA2 nicht mehr nachweisbar. Bei der weiteren Charakterisierung der 5-LO-Inhibition, z.B. hinsichtlich der 5-HETE-Biosynthese, konnte durch SZK5 bei einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ nach der Stimulation mit A23187 mit $> 85\%$ die stärkste Inhibition verzeichnet werden.

Der Vorteil der Substanzen CTA1 und CTA2 gegenüber SZK1 und SZK5, welcher sich allerdings nachteilig auf die entzündungshemmende Therapie auswirken könnte, liegt in der potenten Hemmung der 5-LO und der damit erhöhten Synthese weiterer Produkte des AA-Stoffwechsels. Aufgrund der starken Inhibition der LT-Biosynthese verschiebt sich das

Gleichgewicht der verschiedenen Produktionswege zugunsten der proinflammatorischen PG. Trotzdem gaben die starken inhibitorischen Effekte der Substanzen auf die 5-LO und LTC₄S Anlass zur Untersuchung der Substanzen in humanem Vollblut.

Dazu wurde humanes Heparin-Vollblut mit den Testsubstanzen [3 und 30 μ M] 20 min vorinkubiert und anschließend mit A23187 [30 μ M] für weitere 10 min stimuliert. Die höheren Konzentrationen wurden aufgrund einer wegen des lipophilen Grundgerüsts der Testsubstanzen vermuteten erhöhten Plasmaproteinbindung gewählt. Betrachtet man die Lipophilie der Substanzen, dürfte SZK1 die höchste Plasmaproteinbindung aufweisen, gefolgt von SZK5, was den Fluor-Substituenten geschuldet ist. Auch CTA1 und CTA2 weisen lipophile Eigenschaften auf, wobei CTA2 durch die zusätzlichen beiden Benzolringe stärker an Albumin und andere Plasmaproteine binden dürfte als CTA1. Die Analyse des LM-Profiles (**Abb. 28 A**) ergab für CTA1 und CTA2 ähnliche Ergebnisse wie bei den Untersuchungen in Monozyten. Es konnte eine potente Inhibition der LT-Biosynthese (LTC₄, LTB₄, 5-HETE) bei unbeeinflusster Bildung der PG und der 15-HETE gezeigt werden. Mit einer Inhibition um > 80% (CTA1) bzw. > 60% (CTA2) wurde die LTC₄-Synthese am stärksten vermindert. Insgesamt fiel der inhibitorische Effekt von CTA1 stärker aus als der von CTA2. Ob die Inhibition der LTC₄-Synthese tatsächlich durch die Hemmung der LTC₄S oder auch über eine Inhibition der 5-LO bzw. FLAP vermittelt wird, bleibt zu erforschen. Nach den bereits geringeren Effekten der Testsubstanzen SZK1 und SZK5 in Monozyten (**Abb. 27**) war in Vollblut (**Abb. 28 B**) keine inhibitorische Wirkung dieser dualen Inhibitoren mehr zu verzeichnen. Dies lässt sich vermutlich durch die Lipophilie und die Elektronegativität der Fluorsubstituenten begründen. Aufgrund der hohen Elektronegativität von Fluor, welches in SZK1 und SZK5 vorhanden ist, verliert das Molekül an Hydrophilie und damit die Möglichkeit, Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden. Durch die lipophilen Eigenschaften der Substanzen werden sie stark von Plasmaproteinen wie Albumin gebunden und gelangen so nicht zu ihrem Wirkort. CTA1 und CTA2 sind durch ihre Hydroxylgruppen hydrophiler als SZK1 und SZK5, erhalten jedoch durch die Benzolringe einen lipophilen Charakter, wodurch sich auch die geringe Abschwächung der IC₅₀-Werte in Vollblut im Vergleich zu Monozyten erklären lässt. CTA2 ist durch die Addition von zwei Benzolringen lipophiler als CTA1, was auch die etwas geringere Hemmwirkung im Vergleich der beiden Substanzen belegt. Trotzdem zeigt CTA1 bei einer Konzentration von 3 μ M noch eine Inhibition der LTC₄-Produktion um ~60%. Jedoch reicht dieser Wert nicht an die Inhibition durch den etablierten 5-LO-Inhibitor Zileuton (~70%) in gleicher Konzentration heran. Zudem

benötigen CTA1 und CTA2 eine vermutliche sehr große Bindungstasche, was auf ihr starres Grundgerüst (über Lacton verbundene Phenylgruppen) zurückzuführen ist.

Aufgrund der Aufteilung der für die LT-Biosynthese relevanten Enzyme auf verschiedene Kompartimente der Zelle wie Zytoplasma, Nukleus, Zell- und Kernmembran wurde die Translokation und Interaktion von 5-LO und FLAP untersucht. Dies erfolgte mittels PLA nach 20-minütiger Stimulation von Monozyten mit A23187 [2,5 μ M]. Monozyten wurden als Testsystem gewählt, da sie unter den Leukozyten zusammen mit den Neutrophilen die höchste Syntheserate an 5-LO-Produkten aufweisen (Radmark et al. 2007). Die Visualisierung der Protein-Protein-Interaktion von 5-LO und FLAP an der Kernmembran erfolgte mit dem PLA fluoreszenzmikroskopisch, wobei bei einer Interaktion der beiden Proteine ein magentafarbenes Fluoreszenzsignal unter dem Mikroskop sichtbar wird (Soderberg et al. 2006).

Die 5-LO/FLAP-Interaktion wurde durch die Substanzen CTA2, SZK1 und SZK5 [3 μ M] unterbunden und durch CTA1 im Vergleich zur stimulierten DMSO-Kontrolle verringert (**Abb. 30**). Die Hemmung der 5-LO/FLAP-Interaktion war ebenfalls nach Inkubation der Zellen mit dem FLAP-Inhibitor MK886 sichtbar, jedoch nicht bei der mit dem 5-LO-Inhibitor Zileuton (Gerstmeier et al. 2016a). Dies spricht dafür, dass die Substanzen CTA2, SZK1 und SZK5 zusätzlich zu ihrer direkten 5-LO-Hemmung auch die Interaktion der 5-LO mit dessen Helferprotein FLAP inhibieren. Bei CTA1 ist dieser Effekt hingegen geringer ausgeprägt und die direkte 5-LO-Inhibition überwiegt. FLAP-Inhibitoren wurden lange als kompetitive Hemmstoffe des Substrats AA angesehen; inzwischen wird allerdings eher eine Blockade der Adapterfunktion der Substrate AA und 5-HPETE durch diese Inhibitoren vermutet (Gerstmeier et al. 2016a). Über diesen Mechanismus könnten auch die Substanzen CTA2, SZK1 und SZK5 ihre inhibitorische Wirkung entfalten. Zur genaueren Charakterisierung der Testsubstanzen als FLAP-Inhibitoren wäre die Durchführung des PLA in einer mit 5-LO und FLAP stabil transfizierten Zelllinie (HEK293 Zellen) von Interesse (Hafner et al. 2015).

Die dualen Inhibitoren wurden auch hinsichtlich ihrer direkten Wirkung auf die PG-Biosynthese getestet. Dazu wurde isolierte COX-1 [50 U/ml] bzw. COX-2 [20 U/ml] mit AA (COX-1 [5 μ M], COX-2 [2 μ M]) für 5 min stimuliert und die Produktbildung (12-HHT) anschließend über die HPLC quantifiziert. Keine der Testsubstanzen wies eine Hemmung bis zu >10 μ M auf (**Abb. 29**). Durch CTA1 trat sogar eine verstärkte Biosynthese der PG auf. Für die Substanzen CTA2, SZK1 und SZK5 konnte in zuvor durchgeführten Versuchen ebenfalls keine Wirkung auf die COX-2 detektiert werden, auf die COX-1 zeigte CTA2 einen geringen inhibitorischen Effekt (Hemmung um ~40%) bei 10 μ M, SZK5 bereits bei 3 μ M (Cantone et

al., unpublizierte Daten). Diese deutlich höheren Konzentrationen im Vergleich zu denen, die für eine 5-LO-Inhibition benötigt werden, könnten sich positiv auf mögliche Nebenwirkungen (z.B. die Gastrototoxizität) auswirken, welche von den NSAR bekannt sind (Patrignani und Patrono 2015). An diese Zusammenhänge wurde nach der potenten Inhibition rekombinanter mPGES-1 (IC_{50} -Werte $< 0,7 \mu M$ (**Tab. 2**) allerdings nicht gedacht, da diese Werte verglichen mit anderen getesteten sowohl synthetischen als auch pflanzlichen Substanzen (Psarra et al. 2017, Koeberle und Werz 2018) Hoffnungen auf die Entwicklung eines mPGES-1-Inhibitors gaben, was auch dem ursprünglichen Design der Substanzen entsprach. Dieser Effekt auf die mPGES-1 war jedoch in Vollblut (**Abb. 28 A**) nicht mehr nachweisbar, was für eine höhere Affinität der Testsubstanzen CTA1 und CTA2 gegenüber der 5-LO spricht. Aus diesem Grund wäre die Überprüfung der Klassifizierung der Substanzen als mPGES-1/LTC₄S-Inhibitoren von Bedeutung und es sollte die Überlegung angestellt werden, ob es sich bei diesen aufgrund der ausgeprägten Hemmung der 5-LO und LTC₄S nicht eher um Inhibitoren dieser beiden Enzyme handelt, auch wenn eine Inhibition der mPGES-1 im isolierten Enzym beobachtet worden war.

Die potente antiinflammatorische Wirkung der Substanzen wird vermutlich hauptsächlich über die duale Inhibition der 5-LO bzw. der LTC₄S und mPGES-1 vermittelt, was ein günstigeres Nebenwirkungsprofil im Vergleich zu NSAR und Coxiben verspricht (Celotti und Laufer 2001, Meirer et al. 2014). Durch die duale Hemmung selektiver Enzyme der PG- und LT-Biosynthese werden proinflammatorische LM wie PGE₂ vermindert synthetisiert, die Biosynthese antiinflammatorischer LM und LX bleibt hingegen unbeeinflusst, was die Entzündungsreaktion eindämmt (Koeberle et al. 2016).

Aufgrund der oben präsentierten Datenlage und nach Überprüfung der Zytotoxizität der dualen Inhibitoren werden die Substanzen CTA1 und CTA2 zurzeit bereits *in vivo* getestet. Erste Untersuchungen an Mäusen (Pace et al., unpublizierte Daten), bei denen unter etablierten Versuchsbedingungen eine Zymosan-induzierte Peritonitis (30 min) (Cash et al. 2009) erzeugt wurde, was einer sterilen Inflammation entspricht, lieferten weitere vielversprechende Daten. CTA1 [10 mg/kg] war dabei in der Lage, die LTC₄-Synthese signifikant zu reduzieren. Durch CTA2 [10 mg/kg] konnte dagegen nur ein geringer inhibitorischer Effekt erreicht werden. Der Kontrollinhibitor MK886 [1 mg/kg] inhibierte die LTC₄-Synthese jedoch in einer 10-fach geringeren Konzentration deutlich stärker als CTA1 und CTA2. In weiteren Untersuchungen mittels EVANS-BLUE-Farbstoff (Radu und Chernoff 2013) konnte für CTA1 bei einer ebenfalls Zymosan-induzierten Peritonitis (Cash et al. 2009) eine signifikante Verminderung

der Gefäßpermeabilität detektiert werden; CTA2 reduzierte diese nur geringfügig. Weiterhin wurde die Zellinfiltration nach vierstündiger Peritonitis untersucht, welche durch CTA2 signifikant, durch CTA1 nur wenig reduziert wurde. Die PGE₂-Synthese wurde *in vivo* deutlich verstärkt, was mit den Ergebnissen der *in vitro*-Untersuchungen (**Abb. 28 A**) übereinstimmt. Für die Substanzen SZK1 und SZK5 sind keine *in vivo*-Versuche geplant, da der fehlende Effekt der Substanzen in Vollblut die Vermutung nahe legt, dass auch *in vivo* kein Effekt detektierbar sein wird.

Aufgrund der potenten Effekte der Substanzen CTA1 und CTA2 *in vivo* und *in vitro* sind weitere Untersuchungen zur Charakterisierung des Wirkprofils geplant. Dabei wäre die Erstellung eines LM-Profiles in weiteren Zellen wie beispielsweise Makrophagen interessant, da diese einen bedeutenden Anteil am Entzündungsgeschehen, vor allem in der Auflösung der Inflammation, haben. Weiterhin wäre es von Interesse, den Mechanismus der 5-LO-Inhibition näher zu charakterisieren, um herauszubekommen, ob die Substanzen die 5-LO kompetitiv oder nicht-kompetitiv bzw. allosterisch hemmen und ob es sich bei den Hemmstoffen um reversible oder irreversible Inhibitoren handelt. Da die Entzündung eine Stresssituation für die Zellen darstellt und Stress die Entstehung von Radikalen bedeutet, könnten die Substanzen weiterhin auf mögliche antioxidative Eigenschaften hin überprüft werden. Sauerstoffradikale im Körper begünstigen die Entstehung von Diabetes und Arteriosklerose wie auch die Bildung von Krebszellen und sind am Alterungsprozess beteiligt (Holmstrom und Finkel 2014). Eine mögliche antioxidative Wirkung der Inhibitoren könnte diesem entgegenwirken.

6. SCHLUSSFOLGERUNGEN

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die nähere Charakterisierung sowohl synthetischer als auch pflanzlicher Inhibitoren der Synthese von Entzündungsmediatoren. Vor allem deren Einfluss auf die LM-Biosynthese aus AA über die 5-LO zu den LT und den COX/mPGES-1-Weg zu den PG stand hierbei im Mittelpunkt.

Extrakte aus den in Sri Lanka beheimateten Pflanzen *Garcinia cambogia*, *Pothos scandens*, *Nyctanthes arbor-tristis*, und *Plectranthus zeylanicus* wurden hinsichtlich ihrer Wirkung auf die 5-LO und mPGES-1 untersucht. Dabei stellten sich die Extrakte aus GC als potente duale Inhibitoren der 5-LO und der mPGES-1 heraus, PL erwies sich in ersten Untersuchungen als selektiver Inhibitor der 5-LO und POT als selektiver Hemmstoff der mPGES-1 (**Tab. 3**) SF konnte weder die Enzymaktivität der 5-LO noch die der mPGES-1 signifikant inhibieren, weshalb der Extrakt nicht weiter getestet wurde. Ob Wechselwirkungen mit anderen Enzymen des AA-Stoffwechsels zu verzeichnen sind, bleibt zu erforschen. Die Untersuchungen stellen aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse die Basis für weiterführende Versuche bezüglich der Entwicklung eines pflanzlichen antiinflammatorischen Therapeutikums dar. Ob die Extrakte nach Ausschluss einer zytotoxischen Wirkung und weiteren Versuchen auch *in vivo* ihre inhibitorische Wirkung entfalten, bleibt zu hoffen.

Das erfolgversprechende Konzept der dualen Inhibition der LT- und PG-Biosynthese beruht auf der Inhibition proinflammatorischer LM bei unbeeinflusster Synthese physiologisch relevanter bzw. antiinflammatorischer LM. Diese Art der Wirkung konnte im zweiten Teil der Arbeit an den synthetischen Inhibitoren CTA1 und CTA2 sowie SZK1 und SZK5 gezeigt werden. Aufgrund einer potenten Inhibition der strukturell ähnlichen Enzyme mPGES-1 und LTC₄S (**Tab. 2**) (Mitglieder der MAPEG-Superfamilie) wurden die dualen Inhibitoren hinsichtlich ihrer Wirkung auf weitere Enzyme des AA-Stoffwechsels untersucht und in zellulären Systemen genauer charakterisiert. Dabei stellten sich die Substanzen als potente Inhibitoren der 5-LO heraus, mit einer wesentlich höheren Affinität gegenüber dieser als gegenüber der mPGES-1. Untersuchungen am isolierten Enzym zeigten, dass CTA1 und CTA2 die 5-LO auf direktem Weg hemmen. In zellulären Systemen (PMNL, Monozyten, Vollblut) nahm die inhibitorische Potenz etwas ab, was jedoch zu erwarten war. In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass CTA2, SZK1 und SZK5 die Ausbildung des 5-LO/FLAP-Komplexes an der Kernmembran inhibieren. Keine der Testsubstanzen wies eine Beeinflussung der COX-1 und COX-2 auf, welche für die Produktion physiologisch relevanter PG zuständig

sind. Dies lässt auf geringere Nebenwirkungen der Testsubstanzen gegenüber den NSAR hoffen. Weiterhin konnte in der Analyse des LM-Profiles von Monozyten und in Vollblut gezeigt werden, dass die Produktion der antiinflammatorischen SPM durch die dualen Inhibitoren nicht reduziert bzw. sogar gesteigert wurde, weshalb die Substanzen die physiologische Auflösung der Entzündung begünstigen könnten. Die Inhibitoren CTA1 und CTA2 zeigten zudem auch in humanem Vollblut eine Inhibition der LT-Synthese, weshalb diese Substanzen derzeit in der Arbeitsgruppe in Tierversuchen getestet werden. SZK1 und SZK5 konnten in humanem Vollblut keine LM-Hemmung mehr bewirken, was sich durch ihre hohe Lipophilie und starke Elektronegativität erklären lässt. Aus diesem Grund werden SZK1 und SZK5 nicht *in vivo* getestet.

7. LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS

- Abramovitz M, Wong E, Cox ME, Richardson CD, Li C, Vickers PJ. 1993. 5-lipoxygenase-activating protein stimulates the utilization of arachidonic acid by 5-lipoxygenase. *Eur J Biochem*, 215 (1):105-111.
- Ago H, Kanaoka Y, Irikura D, Lam BK, Shimamura T, Austen KF, Miyano M. 2007. Crystal structure of a human membrane protein involved in cysteinyl leukotriene biosynthesis. *Nature*, 448 (7153):609-612.
- Ago H, Okimoto N, Kanaoka Y, Morimoto G, Ukita Y, Saino H, Taiji M, Miyano M. 2013. A leukotriene C4 synthase inhibitor with the backbone of 5-(5-methylene-4-oxo-4,5-dihydrothiazol-2-ylamino) isophthalic acid. *J Biochem*, 153 (5):421-429.
- Agrawal J, Pal A. 2013. *Nyctanthes arbor-tristis* Linn--a critical ethnopharmacological review. *J Ethnopharmacol*, 146 (3):645-658.
- Ahmad S, Ytterberg AJ, Thulasigam M, Tholander F, Bergman T, Zubarev R, Wetterholm A, Rinaldo-Matthis A, Haeggstrom JZ. 2016. Phosphorylation of Leukotriene C4 Synthase at Serine 36 Impairs Catalytic Activity. *J Biol Chem*, 291 (35):18410-18418.
- Albert D, Zundorf I, Dingermann T, Muller WE, Steinhilber D, Werz O. 2002. Hyperforin is a dual inhibitor of cyclooxygenase-1 and 5-lipoxygenase. *Biochem Pharmacol*, 64 (12):1767-1775.
- Allen S, Dashwood M, Morrison K, Yacoub M. 1998. Differential leukotriene constrictor responses in human atherosclerotic coronary arteries. *Circulation*, 97 (24):2406-2413.
- Bhosale UA, Quraishi N, Yegnanarayan R, Devasthale D. 2015. A comparative study to evaluate the cardiovascular risk of selective and nonselective cyclooxygenase inhibitors (COX-Is) in arthritic patients. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 26 (1):73-79.
- Bigby TD, Hodulik CR, Arden KC, Fu L. 1996. Molecular cloning of the human leukotriene C4 synthase gene and assignment to chromosome 5q35. *Mol Med*, 2 (5):637-646.
- Borgeat P, Hamberg M, Samuelsson B. 1976. Transformation of arachidonic acid and homogamma-linolenic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes. Monohydroxy acids from novel lipoxygenases. *J Biol Chem*, 251 (24):7816-7820.
- Botting RM. 2006. Inhibitors of cyclooxygenases: mechanisms, selectivity and uses. *J Physiol Pharmacol*, 57 Suppl 5:113-124.
- Boyce PC. 2009. A review of *Pothos* L. (Araceae: Pothoideae: Pothoeae) for Thailand. *Thai Forest Bulletin (Botany)*:15-26.
- Brideau C, Chan C, Charleson S, Denis D, Evans JF, Ford-Hutchinson AW, Fortin R, Gillard JW, Guay J, Guevremont D, et al. 1992. Pharmacology of MK-0591 (3-[1-(4-chlorobenzyl)-3-(t-butylthio)-5-(quinolin-2-yl-methoxy)-indol-2-yl]-2,2-dimethyl propanoic acid), a potent, orally active leukotriene biosynthesis inhibitor. *Can J Physiol Pharmacol*, 70 (6):799-807.
- Buckley CD, Gilroy DW, Serhan CN. 2014. Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. *Immunity*, 40 (3):315-327.
- Cash JL, White GE, Greaves DR. 2009. Chapter 17. Zymosan-induced peritonitis as a simple experimental system for the study of inflammation. *Methods Enzymol*, 461:379-396.
- Celotti F, Laufer S. 2001. Anti-inflammatory drugs: new multitarget compounds to face an old problem. The dual inhibition concept. *Pharmacol Res*, 43 (5):429-436.
- Chan CC, Ecclestone P, Nicholson DW, Metters KM, Pon DJ, Rodger IW. 1994. Leukotriene D4-induced increases in cytosolic calcium in THP-1 cells: dependence on extracellular calcium and inhibition with selective leukotriene D4 receptor antagonists. *J Pharmacol Exp Ther*, 269 (3):891-896.

- Chen XS, Funk CD. 2001. The N-terminal "beta-barrel" domain of 5-lipoxygenase is essential for nuclear membrane translocation. *J Biol Chem*, 276 (1):811-818.
- Chesterman CN. 1988. Vascular endothelium, haemostasis and thrombosis. *Blood Rev*, 2 (2):88-94.
- Chiang N, Serhan CN. 2017. Structural elucidation and physiologic functions of specialized pro-resolving mediators and their receptors. *Mol Aspects Med*, 58:114-129.
- Clausson CM, Arngarden L, Ishaq O, Klaesson A, Kuhnemund M, Grannas K, Koos B, Qian X, Ranefall P, Krzywkowski T, Brismar H, Nilsson M, Wahlby C, Soderberg O. 2015. Compaction of rolling circle amplification products increases signal integrity and signal-to-noise ratio. *Sci Rep*, 5:12317.
- Cloutre DL, Preuss HG. 2013. Hydroxycitric acid does not promote inflammation or liver toxicity. *World J Gastroenterol*, 19 (44):8160-8162.
- Crofford LJ. 1997. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J Rheumatol Suppl*, 49:15-19.
- Dahlen SE, Hedqvist P, Hammarstrom S, Samuelsson B. 1980. Leukotrienes are potent constrictors of human bronchi. *Nature*, 288 (5790):484-486.
- DeWitt DL, el-Harith EA, Kraemer SA, Andrews MJ, Yao EF, Armstrong RL, Smith WL. 1990. The aspirin and heme-binding sites of ovine and murine prostaglandin endoperoxide synthases. *J Biol Chem*, 265 (9):5192-5198.
- Di Gennaro A, Haeggstrom JZ. 2012. The leukotrienes: immune-modulating lipid mediators of disease. *Adv Immunol*, 116:51-92.
- Di Micco S, Terracciano S, Cantone V, Fischer K, Koeberle A, Foglia A, Riccio R, Werz O, Bruno I, Bifulco G. 2018. Discovery of new potent molecular entities able to inhibit mPGES-1. *Eur J Med Chem*, 143:1419-1427.
- Dixon RA, Diehl RE, Opas E, Rands E, Vickers PJ, Evans JF, Gillard JW, Miller DK. 1990. Requirement of a 5-lipoxygenase-activating protein for leukotriene synthesis. *Nature*, 343 (6255):282-284.
- Dozier BL, Watanabe K, Duffy DM. 2008. Two pathways for prostaglandin F2 alpha synthesis by the primate periovulatory follicle. *Reproduction*, 136 (1):53-63.
- Engblom D, Saha S, Engstrom L, Westman M, Audoly LP, Jakobsson PJ, Blomqvist A. 2003. Microsomal prostaglandin E synthase-1 is the central switch during immune-induced pyresis. *Nat Neurosci*, 6 (11):1137-1138.
- Evans JF, Ferguson AD, Mosley RT, Hutchinson JH. 2008. What's all the FLAP about?: 5-lipoxygenase-activating protein inhibitors for inflammatory diseases. *Trends Pharmacol Sci*, 29 (2):72-78.
- Everts B, Wahrborg P, Hedner T. 2000. COX-2-Specific inhibitors--the emergence of a new class of analgesic and anti-inflammatory drugs. *Clin Rheumatol*, 19 (5):331-343.
- Falgueyret JP, Hutchinson JH, Riendeau D. 1993. Criteria for the identification of non-redox inhibitors of 5-lipoxygenase. *Biochem Pharmacol*, 45 (4):978-981.
- Feisst C, Pergola C, Rakonjac M, Rossi A, Koeberle A, Dodt G, Hoffmann M, Hoernig C, Fischer L, Steinhilber D, Franke L, Schneider G, Radmark O, Sautebin L, Werz O. 2009. Hyperforin is a novel type of 5-lipoxygenase inhibitor with high efficacy in vivo. *Cell Mol Life Sci*, 66 (16):2759-2771.
- Feltenmark S, Gautam N, Brunnstrom A, Griffiths W, Backman L, Edenius C, Lindbom L, Bjorkholm M, Claesson HE. 2008. Eoxins are proinflammatory arachidonic acid metabolites produced via the 15-lipoxygenase-1 pathway in human eosinophils and mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (2):680-685.
- Ferguson AD, McKeever BM, Xu S, Wisniewski D, Miller DK, Yamin TT, Spencer RH, Chu L, Ujjainwalla F, Cunningham BR, Evans JF, Becker JW. 2007. Crystal structure of

- inhibitor-bound human 5-lipoxygenase-activating protein. *Science*, 317 (5837):510-512.
- Filgueiras LR, Brandt SL, Wang S, Wang Z, Morris DL, Evans-Molina C, Mirmira RG, Jancar S, Serezani CH. 2015. Leukotriene B₄-mediated sterile inflammation promotes susceptibility to sepsis in a mouse model of type 1 diabetes. *Sci Signal*, 8 (361):ra10.
- Fischer L, Hornig M, Pergola C, Meindl N, Franke L, Tanrikulu Y, Dodt G, Schneider G, Steinhilber D, Werz O. 2007. The molecular mechanism of the inhibition by licofelone of the biosynthesis of 5-lipoxygenase products. *Br J Pharmacol*, 152 (4):471-480.
- Fitzgerald GA. 2004. Coxibs and cardiovascular disease. *N Engl J Med*, 351 (17):1709-1711.
- Fuster V, Sweeny JM. 2011. Aspirin: a historical and contemporary therapeutic overview. *Circulation*, 123 (7):768-778.
- Gallagher R, Collins S, Trujillo J, McCredie K, Ahearn M, Tsai S, Metzgar R, Aulakh G, Ting R, Ruscetti F, Gallo R. 1979. Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 54 (3):713-733.
- Gerstmeier J, Weinigel C, Rummler S, Radmark O, Werz O, Garscha U. 2016a. Time-resolved in situ assembly of the leukotriene-synthetic 5-lipoxygenase/5-lipoxygenase-activating protein complex in blood leukocytes. *FASEB J*, 30 (1):276-285.
- Gerstmeier J, Newcomer ME, Dennhardt S, Romp E, Fischer J, Werz O, Garscha U. 2016b. 5-Lipoxygenase-activating protein rescues activity of 5-lipoxygenase mutations that delay nuclear membrane association and disrupt product formation. *FASEB J*, 30 (5):1892-1900.
- Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. 1973. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst*, 51 (5):1417-1423.
- Gilbert NC, Bartlett SG, Waight MT, Neau DB, Boeglin WE, Brash AR, Newcomer ME. 2011. The structure of human 5-lipoxygenase. *Science*, 331 (6014):217-219.
- Gillard J, Ford-Hutchinson AW, Chan C, Charleson S, Denis D, Foster A, Fortin R, Leger S, McFarlane CS, Morton H, et al. 1989. L-663,536 (MK-886) (3-[1-(4-chlorobenzyl)-3-t-butyl-thio-5-isopropylindol-2-yl]-2,2 - dimethylpropanoic acid), a novel, orally active leukotriene biosynthesis inhibitor. *Can J Physiol Pharmacol*, 67 (5):456-464.
- Glader P, Jiang F, Aurell Holmberg A, Hamblet C, Lamm Bergström E, Lisbeth K, Wågberg F, Lundqvist A, Swedin L, Rohman M, Vinblad J, Wissing B-M, Andreasson T, Hafsten L, Bergquist H, Munck af Rosenschöld M, Davis A. 2017. Pharmacological properties of novel LTC₄ synthase inhibitor. *European Respiratory Journal*, 50 (suppl 61).
- Goldblatt MW. 1935. Properties of human seminal plasma. *J Physiol*, 84 (2):208-218.
- Greene ER, Huang S, Serhan CN, Panigrahy D. 2011. Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 96 (1-4):27-36.
- Griffith TN, Varela-Nallar L, Dinamarca MC, Inestrosa NC. 2010. Neurobiological effects of Hyperforin and its potential in Alzheimer's disease therapy. *Curr Med Chem*, 17 (5):391-406.
- Gudis K, Tatsuguchi A, Wada K, Futagami S, Nagata K, Hiratsuka T, Shinji Y, Miyake K, Tsukui T, Fukuda Y, Sakamoto C. 2005. Microsomal prostaglandin E synthase (mPGES)-1, mPGES-2 and cytosolic PGES expression in human gastritis and gastric ulcer tissue. *Lab Invest*, 85 (2):225-236.
- Gupta S, Duraiswamy B, Satishkumar MN. 2013. Peritoneal mast cell stabilization potential of *Pothos scandens* L. *Indian J Pharmacol*, 45 (1):83-86.
- Haeggstrom JZ, Funk CD. 2011. Lipoxygenase and leukotriene pathways: biochemistry, biology, and roles in disease. *Chem Rev*, 111 (10):5866-5898.

- Hafner AK, Gerstmeier J, Hornig M, George S, Ball AK, Schroder M, Garscha U, Werz O, Steinhilber D. 2015. Characterization of the interaction of human 5-lipoxygenase with its activating protein FLAP. *Biochim Biophys Acta*, 1851 (11):1465-1472.
- Hall ER, Tuan WM, Venton DL. 1986. Production of platelet thromboxane A₂ inactivates purified human platelet thromboxane synthase. *Biochem J*, 233 (3):637-641.
- Hammarberg T, Provost P, Persson B, Radmark O. 2000. The N-terminal domain of 5-lipoxygenase binds calcium and mediates calcium stimulation of enzyme activity. *J Biol Chem*, 275 (49):38787-38793.
- Haneefa KPM, Hanan KS, Saraswathi R, Mohanta GP, Nayar C. 2010. Formulation and evaluation of herbal gel of *Pothos scandens* Linn. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 3 (12):988-992.
- Hawkey CJ. 1999. COX-2 inhibitors. *Lancet*, 353 (9149):307-314.
- Hegg EL, Que L, Jr. 1997. The 2-His-1-carboxylate facial triad--an emerging structural motif in mononuclear non-heme iron(II) enzymes. *Eur J Biochem*, 250 (3):625-629.
- Hinz B, Brune K. 1999. [COX-1 and COX-2: functions and pharmacological effects]. *Pharm Unserer Zeit*, 28 (1):21-29.
- Holmstrom KM, Finkel T. 2014. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15 (6):411-421.
- Huang H, Zeng Z, Li J, Zhang L, Chen Y. 2010. Variants of arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein (ALOX5AP) gene and risk of coronary heart disease: A meta-analysis. *Arch Med Res*, 41 (8):634-641.
- Hui Y, Funk CD. 2002. Cysteinyl leukotriene receptors. *Biochem Pharmacol*, 64 (11):1549-1557.
- Hwang SH, Wecksler AT, Wagner K, Hammock BD. 2013. Rationally designed multitarget agents against inflammation and pain. *Curr Med Chem*, 20 (13):1783-1799.
- Ito S, Okuda-Ashitaka E, Minami T. 2001. Central and peripheral roles of prostaglandins in pain and their interactions with novel neuropeptides nociceptin and nocistatin. *Neurosci Res*, 41 (4):299-332.
- Ivanov I, Heydeck D, Hofheinz K, Roffeis J, O'Donnell VB, Kuhn H, Walther M. 2010. Molecular enzymology of lipoxygenases. *Arch Biochem Biophys*, 503 (2):161-174.
- Jakobsson PJ, Thoren S, Morgenstern R, Samuelsson B. 1999a. Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (13):7220-7225.
- Jakobsson PJ, Morgenstern R, Mancini J, Ford-Hutchinson A, Persson B. 1999b. Common structural features of MAPEG -- a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. *Protein Sci*, 8 (3):689-692.
- Jakobsson PJ, Steinhilber D, Odlander B, Radmark O, Claesson HE, Samuelsson B. 1992. On the expression and regulation of 5-lipoxygenase in human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (8):3521-3525.
- Joo M, Sadikot RT. 2012. PGD synthase and PGD₂ in immune response. *Mediators Inflamm*, 2012:503128.
- Kakoti BB, Pradhan P, Borah S, Mahato K, Kumar M. 2013. Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of the Methanolic Stem Bark Extract of *Nyctanthes arbor-tristis* Linn. *Biomed Research International*.
- Kalia M, Costa ESJ. 2015. Biomarkers of psychiatric diseases: current status and future prospects. *Metabolism*, 64 (3 Suppl 1):S11-15.
- Kanaoka Y, Boyce JA. 2004. Cysteinyl leukotrienes and their receptors: cellular distribution and function in immune and inflammatory responses. *J Immunol*, 173 (3):1503-1510.

- Kawahara K, Hohjoh H, Inazumi T, Tsuchiya S, Sugimoto Y. 2015. Prostaglandin E2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. *Biochim Biophys Acta*, 1851 (4):414-421.
- Kent SE, Bentley JH, Miller D, Sterling R, Menendez R, Tarpay M, Pearlman DS, Norris V. 2014. The effect of GSK2190915, a 5-lipoxygenase-activating protein inhibitor, on exercise-induced bronchoconstriction. *Allergy Asthma Proc*, 35 (2):126-133.
- Khan M, Fraser A. 2012. Cox-2 inhibitors and the risk of cardiovascular thrombotic events. *Ir Med J*, 105 (4):119-121.
- Kim J, Jeong SH, Lee W, Min H. 2017. In vitro anti-inflammatory activity of *Pothos scandens* extract in RAW 264.7 cells. *Food Science and Biotechnology*, 26 (3):791-799.
- Kim YJ, Choi MS, Park YB, Kim SR, Lee MK, Jung UJ. 2013. *Garcinia Cambogia* attenuates diet-induced adiposity but exacerbates hepatic collagen accumulation and inflammation. *World J Gastroenterol*, 19 (29):4689-4701.
- Kleinschmidt TK, Haraldsson M, Basavarajappa D, Lundeberg E, Thulasingham M, Ekoff M, Fauland A, Lehmann C, Kahnt AS, Lindbom L, Haeggstrom JZ. 2015. Tandem Benzophenone Amino Pyridines, Potent and Selective Inhibitors of Human Leukotriene C4 Synthase. *J Pharmacol Exp Ther*, 355 (1):108-116.
- Knights KM, Cassidy MR, Drew R. 1986. Benoxaprofen induced toxicity in isolated rat hepatocytes. *Toxicology*, 40 (3):327-339.
- Koeberle A, Werz O. 2015. Perspective of microsomal prostaglandin E2 synthase-1 as drug target in inflammation-related disorders. *Biochem Pharmacol*, 98 (1):1-15.
- Koeberle A, Werz O. 2018. Natural products as inhibitors of prostaglandin E2 and pro-inflammatory 5-lipoxygenase-derived lipid mediator biosynthesis. *Biotechnol Adv*.
- Koeberle A, Laufer SA, Werz O. 2016. Design and Development of Microsomal Prostaglandin E2 Synthase-1 Inhibitors: Challenges and Future Directions. *J Med Chem*, 59 (13):5970-5986.
- Koeberle A, Siemoneit U, Northoff H, Hofmann B, Schneider G, Werz O. 2009. MK-886, an inhibitor of the 5-lipoxygenase-activating protein, inhibits cyclooxygenase-1 activity and suppresses platelet aggregation. *Eur J Pharmacol*, 608 (1-3):84-90.
- Koeberle A, Siemoneit U, Buhring U, Northoff H, Laufer S, Albrecht W, Werz O. 2008. Licofelone suppresses prostaglandin E2 formation by interference with the inducible microsomal prostaglandin E2 synthase-1. *J Pharmacol Exp Ther*, 326 (3):975-982.
- Kolaczowska E, Kubes P. 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 13 (3):159-175.
- Kramer RM, Sharp JD. 1997. Structure, function and regulation of Ca²⁺-sensitive cytosolic phospholipase A2 (cPLA2). *FEBS Lett*, 410 (1):49-53.
- Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, Herschman HR. 1991. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem*, 266 (20):12866-12872.
- Kurumbail RG, Stevens AM, Gierse JK, McDonald JJ, Stegeman RA, Pak JY, Gildehaus D, Miyashiro JM, Penning TD, Seibert K, Isakson PC, Stallings WC. 1996. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature*, 384 (6610):644-648.
- Lammermann T, Afonso PV, Angermann BR, Wang JM, Kastenmuller W, Parent CA, Germain RN. 2013. Neutrophil swarms require LTB4 and integrins at sites of cell death in vivo. *Nature*, 498 (7454):371-375.
- Lauro G, Tortorella P, Bertamino A, Ostacolo C, Koeberle A, Fischer K, Bruno I, Terracciano S, Gomez-Monterrey IM, Tauro M, Loiodice F, Novellino E, Riccio R, Werz O, Campiglia P, Bifulco G. 2016. Structure-Based Design of Microsomal Prostaglandin E2

- Synthase-1 (mPGES-1) Inhibitors using a Virtual Fragment Growing Optimization Scheme. *ChemMedChem*, 11 (6):612-619.
- Leone S, Ottani A, Bertolini A. 2007. Dual acting anti-inflammatory drugs. *Curr Top Med Chem*, 7 (3):265-275.
- Lewis RA, Soter NA, Diamond PT, Austen KF, Oates JA, Roberts LJ, 2nd. 1982. Prostaglandin D2 generation after activation of rat and human mast cells with anti-IgE. *J Immunol*, 129 (4):1627-1631.
- Li RW, David Lin G, Myers SP, Leach DN. 2003. Anti-inflammatory activity of Chinese medicinal vine plants. *J Ethnopharmacol*, 85 (1):61-67.
- Li YQ, Yin SM, Xie SF, Wang XJ, Ma LP, Nie DN, Wu YD. 2012. [Effect of mPGES-1 inhibitor MK886 on cell cycle of leukemia HL-60 cells]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 20 (5):1072-1076.
- Liening S, Scriba GK, Rummeler S, Weinigel C, Kleinschmidt TK, Haeggstrom JZ, Werz O, Garscha U. 2016. Development of smart cell-free and cell-based assay systems for investigation of leukotriene C4 synthase activity and evaluation of inhibitors. *Biochim Biophys Acta*, 1861 (11):1605-1613.
- Liu M, Yokomizo T. 2015. The role of leukotrienes in allergic diseases. *Allergol Int*, 64 (1):17-26.
- Lukhoba CW, Simmonds MSJ, Paton AJ. 2006. *Plectranthus*: A review of ethnobotanical uses. *Journal of Ethnopharmacology*, 103 (1):1-24.
- Lynch KR, O'Neill GP, Liu Q, Im DS, Sawyer N, Metters KM, Coulombe N, Abramovitz M, Figueroa DJ, Zeng Z, Connolly BM, Bai C, Austin CP, Chateaufneuf A, Stocco R, Greig GM, Kargman S, Hooks SB, Hosfield E, Williams DL, Jr., Ford-Hutchinson AW, Caskey CT, Evans JF. 1999. Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor. *Nature*, 399 (6738):789-793.
- Machinist JM, Mayer MD, Shet MS, Ferrero JL, Rodrigues AD. 1995. Identification of the human liver cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of zileuton (ABT-077) and its N-dehydroxylated metabolite, Abbott-66193. *Drug Metab Dispos*, 23 (10):1163-1174.
- Mahendran P, Vanisree AJ, Shyamala Devi CS. 2002. The antiulcer activity of *Garcinia cambogia* extract against indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *Phytother Res*, 16 (1):80-83.
- Mancini JA, Blood K, Guay J, Gordon R, Claveau D, Chan CC, Riendeau D. 2001. Cloning, expression, and up-regulation of inducible rat prostaglandin e synthase during lipopolysaccharide-induced pyresis and adjuvant-induced arthritis. *J Biol Chem*, 276 (6):4469-4475.
- Mansour M, Tornhamre S. 2004. Inhibition of 5-lipoxygenase and leukotriene C4 synthase in human blood cells by thymoquinone. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 19 (5):431-436.
- Marshall PJ, Kulmacz RJ. 1988. Prostaglandin H synthase: distinct binding sites for cyclooxygenase and peroxidase substrates. *Arch Biochem Biophys*, 266 (1):162-170.
- Martinez Molina D, Wetterholm A, Kohl A, McCarthy AA, Niegowski D, Ohlson E, Hammarberg T, Eshaghi S, Haeggstrom JZ, Nordlund P. 2007. Structural basis for synthesis of inflammatory mediators by human leukotriene C4 synthase. *Nature*, 448 (7153):613-616.
- Mashima R, Okuyama T. 2015. The role of lipoxygenases in pathophysiology; new insights and future perspectives. *Redox Biol*, 6:297-310.
- McMillan RM, Walker ER. 1992. Designing therapeutically effective 5-lipoxygenase inhibitors. *Trends Pharmacol Sci*, 13 (8):323-330.
- Medzhitov R. 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454 (7203):428-435.

- Meirer K, Steinhilber D, Proschak E. 2014. Inhibitors of the arachidonic acid cascade: interfering with multiple pathways. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 114 (1):83-91.
- Mendes RT, Stanczyk CP, Sordi R, Otuki MF, dos Santos FA, Fernandes D. 2012. Selective inhibition of cyclooxygenase-2: risks and benefits. *Rev Bras Reumatol*, 52 (5):767-782.
- Mohan V, Maruthupandian A. 2010. Pharmacognostical and phytochemical studies on pothos scandens L. . *Int J Phytomed* 2:277-283.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65 (1-2):55-63.
- Muller-Peddinghaus R, Kohlsdorfer C, Theisen-Popp P, Fruchtmann R, Perzborn E, Beckermann B, Buhner K, Ahr HJ, Mohrs KH. 1993. BAY X1005, a new inhibitor of leukotriene synthesis: in vivo inflammation pharmacology and pharmacokinetics. *J Pharmacol Exp Ther*, 267 (1):51-57.
- Murakami M, Naraba H, Tanioka T, Semmyo N, Nakatani Y, Kojima F, Ikeda T, Fueki M, Ueno A, Oh S, Kudo I. 2000. Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J Biol Chem*, 275 (42):32783-32792.
- Napagoda M, De Soyza W, WMDGB W, Witharana S, Wijesiriwardhana P, Jayasinghe L. 2017. Antimicrobial and antioxidant activities of *Plectranthus zeylanicus* Benth. . *J Mol Nanom*
- Napagoda M, Gerstmeier J, Wesely S, Popella S, Lorenz S, Scheubert K, Svatos A, Werz O. 2014. Inhibition of 5-lipoxygenase as anti-inflammatory mode of action of *Plectranthus zeylanicus* Benth and chemical characterization of ingredients by a mass spectrometric approach. *J Ethnopharmacol*, 151 (2):800-809.
- Napagoda M, Gerstmeier J, Butschek H, Lorenz S, Kanatiwela D, De Soyza S, Qader M, Nagahawatte A, Wijayarathne GB, Svatos A, Jayasinghe L, Koeberle A, Werz O. 2018. Lipophilic extracts of *Leucas zeylanica*, a multi-purpose medicinal plant in the tropics, inhibit key enzymes involved in inflammation and gout. *J Ethnopharmacol*.
- Needleman P, Turk J, Jakschik BA, Morrison AR, Lefkowitz JB. 1986. Arachidonic acid metabolism. *Annu Rev Biochem*, 55:69-102.
- Needleman P, Moncada S, Bunting S, Vane JR, Hamberg M, Samuelsson B. 1976. Identification of an enzyme in platelet microsomes which generates thromboxane A2 from prostaglandin endoperoxides. *Nature*, 261 (5561):558-560.
- Newcomer ME, Brash AR. 2015. The structural basis for specificity in lipoxygenase catalysis. *Protein Sci*, 24 (3):298-309.
- Okamoto H, Hammarberg T, Zhang YY, Persson B, Watanabe T, Samuelsson B, Radmark O. 2005. Mutation analysis of the human 5-lipoxygenase C-terminus: support for a stabilizing C-terminal loop. *Biochim Biophys Acta*, 1749 (1):123-131.
- Pace S, Pergola C, Dehm F, Rossi A, Gerstmeier J, Troisi F, Pein H, Schaible AM, Weinigel C, Rummler S, Northoff H, Laufer S, Maier TJ, Radmark O, Samuelsson B, Koeberle A, Sautebin L, Werz O. 2017. Androgen-mediated sex bias impairs efficiency of leukotriene biosynthesis inhibitors in males. *J Clin Invest*, 127 (8):3167-3176.
- Panossian A, Hamberg M, Samuelsson B. 1982. On the mechanism of biosynthesis of leukotrienes and related compounds. *FEBS Lett*, 150 (2):511-513.
- Patrignani P, Patrono C. 2015. Cyclooxygenase inhibitors: From pharmacology to clinical read-outs. *Biochim Biophys Acta*, 1851 (4):422-432.
- Penning TD. 2001. Inhibitors of leukotriene A4 (LTA4) hydrolase as potential anti-inflammatory agents. *Curr Pharm Des*, 7 (3):163-179.
- Penrose JF. 1999. LTC4 synthase. *Enzymology, biochemistry, and molecular characterization*. *Clin Rev Allergy Immunol*, 17 (1-2):133-152.
- Peters-Golden M, Henderson WR, Jr. 2007. Leukotrienes. *N Engl J Med*, 357 (18):1841-1854.

- Pettersen D, Davidsson O, Whatling C. 2015. Recent advances for FLAP inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 25 (13):2607-2612.
- Pidgeon GP, Lysaght J, Krishnamoorthy S, Reynolds JV, O'Byrne K, Nie D, Honn KV. 2007. Lipoxygenase metabolism: roles in tumor progression and survival. *Cancer Metastasis Rev*, 26 (3-4):503-524.
- Pistorius EK, Axelrod B. 1974. Iron, an essential component of lipoxygenase. *J Biol Chem*, 249 (10):3183-3186.
- Plante H, Picard S, Mancini J, Borgeat P. 2006. 5-Lipoxygenase-activating protein homodimer in human neutrophils: evidence for a role in leukotriene biosynthesis. *Biochem J*, 393 (Pt 1):211-218.
- Poeckel D, Funk CD. 2010. The 5-lipoxygenase/leukotriene pathway in preclinical models of cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*, 86 (2):243-253.
- Psarra A, Nikolaou A, Kokotou MG, Limnios D, Kokotos G. 2017. Microsomal prostaglandin E2 synthase-1 inhibitors: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*, 27 (9):1047-1059.
- Puppulo M, Varma D, Jansen SA. 2014. A review of analytical methods for eicosanoids in brain tissue. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 964:50-64.
- Puri A, Saxena R, Saxena RP, Saxena KC, Srivastava V, Tandon JS. 1994. Immunostimulant Activity of *Nyctanthes Arbor-Tristis* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 42 (1):31-37.
- Qian J, Tian W, Jiang X, Tamosiuniene R, Sung YK, Shuffle EM, Tu AB, Valenzuela A, Jiang S, Zamanian RT, Fiorentino DF, Voelkel NF, Peters-Golden M, Stenmark KR, Chung L, Rabinovitch M, Nicolls MR. 2015. Leukotriene B4 Activates Pulmonary Artery Adventitial Fibroblasts in Pulmonary Hypertension. *Hypertension*, 66 (6):1227-1239.
- Radmark O, Samuelsson B. 2009. 5-Lipoxygenase: mechanisms of regulation. *J Lipid Res*, 50 Suppl:S40-45.
- Radmark O, Werz O, Steinhilber D, Samuelsson B. 2007. 5-Lipoxygenase: regulation of expression and enzyme activity. *Trends Biochem Sci*, 32 (7):332-341.
- Radmark O, Werz O, Steinhilber D, Samuelsson B. 2015. 5-Lipoxygenase, a key enzyme for leukotriene biosynthesis in health and disease. *Biochim Biophys Acta*, 1851 (4):331-339.
- Radu M, Chernoff J. 2013. An in vivo assay to test blood vessel permeability. *J Vis Exp*, (73):e50062.
- Rao P, Knaus EE. 2008. Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *J Pharm Pharm Sci*, 11 (2):81s-110s.
- Raouf J, Rafique N, Goodman MC, Idborg H, Bergqvist F, Armstrong RN, Jakobsson PJ, Morgenstern R, Spahiu L. 2016. Arg126 and Asp49 Are Essential for the Catalytic Function of Microsomal Prostaglandin E2 Synthase 1 and Ser127 Is Not. *PLoS One*, 11 (9):e0163600.
- Rasha H, Salha A, Thanai A, Zahar A. 2015. The biological importance of *garcinia cambogia*: a review. *Journal of Nutrition & Food Sciences*.
- Rather LJ. 1971. Disturbance of function (functio laesa): the legendary fifth cardinal sign of inflammation, added by Galen to the four cardinal signs of Celsus. *Bull N Y Acad Med*, 47 (3):303-322.
- Roberts LJ, 2nd, Sweetman BJ, Lewis RA, Austen KF, Oates JA. 1980. Increased production of prostaglandin D2 in patients with systemic mastocytosis. *N Engl J Med*, 303 (24):1400-1404.
- Roth DM, Lefer DJ, Hock CE, Lefer AM. 1985. Effects of peptide leukotrienes on cardiac dynamics in rat, cat, and guinea pig hearts. *Am J Physiol*, 249 (3 Pt 2):H477-484.
- Roth GJ, Majerus PW. 1975. The mechanism of the effect of aspirin on human platelets. I. Acetylation of a particulate fraction protein. *J Clin Invest*, 56 (3):624-632.

- Ruan KH, Deng H, So SP. 2006. Engineering of a protein with cyclooxygenase and prostacyclin synthase activities that converts arachidonic acid to prostacyclin. *Biochemistry*, 45 (47):14003-14011.
- Sah AK, Verma VK. 2012. Phytochemicals and Pharmacological Potential of *Nyctanthes arbortristis*: A Comprehensive Review. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*
- Samuelsson B. 1983. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science*, 220 (4597):568-575.
- Samuelsson B. 1987. An elucidation of the arachidonic acid cascade. Discovery of prostaglandins, thromboxane and leukotrienes. *Drugs*, 33 Suppl 1:2-9.
- Samuelsson B, Morgenstern R, Jakobsson PJ. 2007. Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target. *Pharmacol Rev*, 59 (3):207-224.
- Saxena RS, Gupta B, Saxena KK, Srivastava VK, Prasad DN. 1987. Analgesic, antipyretic and ulcerogenic activity of *Nyctanthes arbor tristis* leaf extract. *J Ethnopharmacol*, 19 (2):193-200.
- Schaible AM, Filosa R, Temml V, Krauth V, Matteis M, Peduto A, Bruno F, Luderer S, Roviezzo F, Di Mola A, de Rosa M, D'Agostino B, Weinigel C, Barz D, Koeberle A, Pergola C, Schuster D, Werz O. 2014. Elucidation of the molecular mechanism and the efficacy in vivo of a novel 1,4-benzoquinone that inhibits 5-lipoxygenase. *Br J Pharmacol*, 171 (9):2399-2412.
- Schneider I, Bucar F. 2005. Lipoxygenase inhibitors from natural plant sources. Part 1: Medicinal plants with inhibitory activity on arachidonate 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase[sol]cyclooxygenase. *Phytother Res*, 19 (2):81-102.
- Scholic K, Geisslinger G. 2006. Is mPGES-1 a promising target for pain therapy? *Trends Pharmacol Sci*, 27 (8):399-401.
- Semwal RB, Semwal DK, Vermaak I, Viljoen A. 2015. A comprehensive scientific overview of *Garcinia cambogia*. *Fitoterapia*, 102:134-148.
- Shah R, Thomas R, Mehta DS. 2017. Neutrophil priming: Implications in periodontal disease. *J Indian Soc Periodontol*, 21 (3):180-185.
- Simmons DL, Botting RM, Hla T. 2004. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev*, 56 (3):387-437.
- Sjogren T, Nord J, Ek M, Johansson P, Liu G, Geschwindner S. 2013. Crystal structure of microsomal prostaglandin E2 synthase provides insight into diversity in the MAPEG superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110 (10):3806-3811.
- Smith WL, Marnett LJ. 1991. Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. *Biochim Biophys Acta*, 1083 (1):1-17.
- Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. 2000. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem*, 69:145-182.
- Smyrniotis CJ, Barbour SR, Xia Z, Hixon MS, Holman TR. 2014. ATP allosterically activates the human 5-lipoxygenase molecular mechanism of arachidonic acid and 5(S)-hydroperoxy-6(E),8(Z),11(Z),14(Z)-eicosatetraenoic acid. *Biochemistry*, 53 (27):4407-4419.
- Snowise NG, Clements D, Ho SY, Follows RM. 2013. Addition of a 5-lipoxygenase-activating protein inhibitor to an inhaled corticosteroid (ICS) or an ICS/long-acting beta-2-agonist combination in subjects with asthma. *Curr Med Res Opin*, 29 (12):1663-1674.
- Soderberg O, Leuchowius KJ, Kamali-Moghaddam M, Jarvius M, Gustafsdottir S, Schallmeiner E, Gullberg M, Jarvius J, Landegren U. 2007. Proximity ligation: a specific and versatile tool for the proteomic era. *Genet Eng (N Y)*, 28:85-93.
- Soderberg O, Gullberg M, Jarvius M, Ridderstrale K, Leuchowius KJ, Jarvius J, Wester K, Hydbring P, Bahram F, Larsson LG, Landegren U. 2006. Direct observation of

- individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat Methods*, 3 (12):995-1000.
- Stables MJ, Gilroy DW. 2011. Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. *Prog Lipid Res*, 50 (1):35-51.
- Steinhilber D, Hofmann B. 2014. Recent advances in the search for novel 5-lipoxygenase inhibitors. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 114 (1):70-77.
- Steinke JW, Culp JA. 2007. Leukotriene synthesis inhibitors versus antagonists: the pros and cons. *Curr Allergy Asthma Rep*, 7 (2):126-133.
- Tian W, Jiang X, Sung YK, Qian J, Yuan K, Nicolls MR. 2014. Leukotrienes in pulmonary arterial hypertension. *Immunol Res*, 58 (2-3):387-393.
- Tornhamre S, Schmidt TJ, Nasman-Glaser B, Ericsson I, Lindgren JA. 2001. Inhibitory effects of helenalin and related compounds on 5-lipoxygenase and leukotriene C(4) synthase in human blood cells. *Biochem Pharmacol*, 62 (7):903-911.
- Trebino CE, Stock JL, Gibbons CP, Naiman BM, Wachtmann TS, Umland JP, Pandher K, Lapointe JM, Saha S, Roach ML, Carter D, Thomas NA, Durtschi BA, McNeish JD, Hambor JE, Jakobsson PJ, Carty TJ, Perez JR, Audoly LP. 2003. Impaired inflammatory and pain responses in mice lacking an inducible prostaglandin E synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (15):9044-9049.
- Vecchio AJ, Orlando BJ, Nandagiri R, Malkowski MG. 2012. Investigating substrate promiscuity in cyclooxygenase-2: the role of Arg-120 and residues lining the hydrophobic groove. *J Biol Chem*, 287 (29):24619-24630.
- Vickers PJ, Adam M, Charleson S, Coppolino MG, Evans JF, Mancini JA. 1992. Identification of amino acid residues of 5-lipoxygenase-activating protein essential for the binding of leukotriene biosynthesis inhibitors. *Mol Pharmacol*, 42 (1):94-102.
- von Euler US. 1936. On the specific vaso-dilating and plain muscle stimulating substances from accessory genital glands in man and certain animals (prostaglandin and vesiglandin). *J Physiol*, 88 (2):213-234.
- Wang M, FitzGerald GA. 2010. Cardiovascular biology of microsomal prostaglandin E synthase-1. *Trends Cardiovasc Med*, 20 (6):189-195.
- Wculek SK, Malanchi I. 2015. Neutrophils support lung colonization of metastasis-initiating breast cancer cells. *Nature*, 528 (7582):413-417.
- Weinblatt ME, Kremer JM, Coblyn JS, Helfgott S, Maier AL, Petrillo G, Henson B, Rubin P, Sperling R. 1992. Zileuton, a 5-lipoxygenase inhibitor in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 19 (10):1537-1541.
- Werz O. 2007. Inhibition of 5-lipoxygenase product synthesis by natural compounds of plant origin. *Planta Med*, 73 (13):1331-1357.
- Werz O, Steinhilber D. 2006. Therapeutic options for 5-lipoxygenase inhibitors. *Pharmacol Ther*, 112 (3):701-718.
- Werz O, Gerstmeier J, Garscha U. 2017. Novel leukotriene biosynthesis inhibitors (2012-2016) as anti-inflammatory agents. *Expert Opin Ther Pat*, 27 (5):607-620.
- Werz O, Gerstmeier J, Libreros S, De la Rosa X, Werner M, Norris PC, Chiang N, Serhan CN. 2018. Human macrophages differentially produce specific resolvins or leukotriene signals that depend on bacterial pathogenicity. *Nat Commun*, 9 (1):59.
- Woods JW, Evans JF, Ethier D, Scott S, Vickers PJ, Hearn L, Heibin JA, Charleson S, Singer, II. 1993. 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein are localized in the nuclear envelope of activated human leukocytes. *J Exp Med*, 178 (6):1935-1946.
- Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL. 1991. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 (7):2692-2696.

- Xu D, Rowland SE, Clark P, Giroux A, Cote B, Guiral S, Salem M, Ducharme Y, Friesen RW, Methot N, Mancini J, Audoly L, Riendeau D. 2008. MF63 [2-(6-chloro-1H-phenanthro[9,10-d]imidazol-2-yl)-isophthalonitrile], a selective microsomal prostaglandin E synthase-1 inhibitor, relieves pyresis and pain in preclinical models of inflammation. *J Pharmacol Exp Ther*, 326 (3):754-763.
- Zanoli P. 2004. Role of hyperforin in the pharmacological activities of St. John's Wort. *CNS Drug Rev*, 10 (3):203-218.
- Zarghi A, Arfaei S. 2011. Selective COX-2 Inhibitors: A Review of Their Structure-Activity Relationships. *Iran J Pharm Res*, 10 (4):655-683.
- Zhang YY, Radmark O, Samuelsson B. 1992. Mutagenesis of some conserved residues in human 5-lipoxygenase: effects on enzyme activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (2):485-489.

ANHANG 1: LEBENSLAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Hannah Butschek
Geburtstag	14. September 1993
Geburtsort	Saulgau
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

SCHULISCHER WERDEGANG

09/2003 – 06/2012	Störck-Gymnasium in Bad Saulgau Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Note 1,6)
09/1999 – 07/2003	Berta-Hummel-Schule in Bad Saulgau

HOCHSCHULAUSBILDUNG

Seit 07/2017	Promotion am Institut für Pharmazie der Friedrich-Schiller-Universität Jena unter Prof. Dr. Werz und apl. Prof. Dr. Lupp
Seit 10/2013	Studium der Zahnmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena Abschluss: Physikum im April 2016 (Note 1,0) Abschluss Staatsexamen Zahnmedizin im Dezember 2018 (Note 1,0)

Jena, den 04. Juli 2019

Hannah Butschek

ANHANG 2: EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Dr. Jana Gerstmeier, Dr. Simona Pace und apl. Prof. Dr. Amelie Lupp,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 04. Juli 2019

Hannah Butschek

ANHANG 3: DANKSAGUNGEN

An dieser Stelle möchte ich mich herzlichst bei Frau apl. Prof. Dr. Lupp und Herrn Prof. Dr. Werz für das Ermöglichen dieser Arbeit bedanken. Frau apl. Prof. Dr. Lupp stand mir mit ihrem immensen Fachwissen und ihrer langjährigen Erfahrung stets zur Seite und brachte mich durch ihre versierten Anmerkungen in der Verschriftlichung dieser Arbeit voran. Herr Prof. Dr. Werz ermöglichte es mir, die vorliegende Arbeit am Institut für Pharmazie der FSU Jena experimentell durchzuführen, was ohne die Bereitstellung der benötigten Arbeitsmaterialien, Geräte und Laborplätze nicht möglich gewesen wäre – vielen Dank dafür.

Besonderer Dank gilt dabei auch der gesamten Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Werz, welche mich herzlich aufnahm, motiviert und geduldig in der experimentellen Durchführung unterstützte sowie bereitwillig und ausführlich alle meine Fragen beantwortete.

Insbesondere möchte ich mich hier bei Dr. Jana Gerstmeier für die herausragende Supervision und allzeitige Unterstützung bedanken. Durch ihr Engagement, Wissen und außerordentliches Talent in der Lehre wurde in mir das Interesse an den Möglichkeiten einer pharmakologischen Modulation des Entzündungsgeschehens geweckt. Geduldig und ausführlich erläuterte sie mir die Hintergründe und beantwortete mir zu jeder Zeit all meine Fragen. Danke Jana für Deine intensive Betreuung, Deine sowohl theoretische als auch praktische Unterstützung und Dein immer offenes Ohr.

Außerdem gilt mein Dank Dr. Simona Pace für ihre ausführlichen Erklärungen und Hilfe, nicht nur während des PLA- und Vollblut-Assays.

Nicht zuletzt danke ich außerdem meinen Freunden, die mich auch in schwierigen Zeiten immer wieder motiviert haben und mir sowohl durch ihr bereitwilliges Zuhören als auch interessiertes Nachfragen zur Seite gestanden haben. Für Eure jahrelange Freundschaft bin ich Euch unendlich dankbar.

Großer Dank gilt zudem meiner Familie für das Ermöglichen des Studiums meiner Träume und der ständigen nicht nur finanziellen Unterstützung. Nach dem Motto „How to eat an elephant – bit by bit“ habt ihr mir auch in anstrengenden Zeiten geholfen voranzukommen. Danke für Eure Zeit, Eure Motivation und Eure immerwährende Liebe.

Zuletzt möchte ich meinem Freund Joachim danken, der mir seit Jahren Tag für Tag Rückhalt gibt, Vertrauen und unendliche Liebe schenkt. Danke, dass Du da bist.